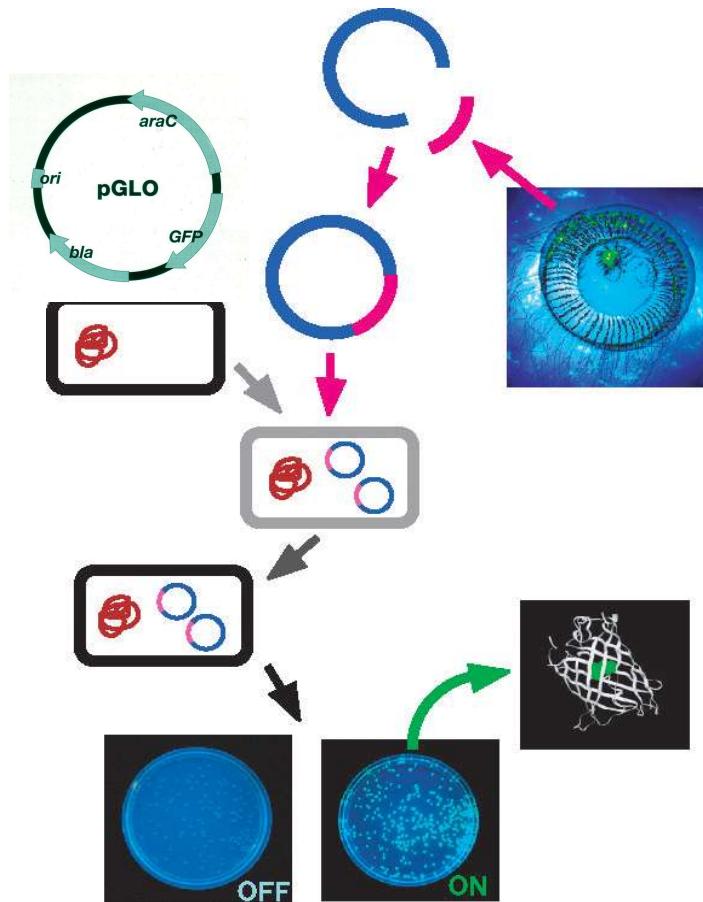


東京農工大学遺伝子実験施設
第 24 回「教員のための遺伝子組換え実験教育研修会」
2025 年 7 月 24~25 日

研修 2, 3, 4 資料①

教育目的遺伝子組換え実験
「GFP 遺伝子による大腸菌の形質転換」
2025 年度版

大藤道衛



1. はじめに

「遺伝子組換え実験」(組換え DNA 実験)を授業の中に取り入れることは、生徒が、実験を通じ实物に触れ、生命科学における基本概念であるセントラルドグマ(DNA→RNA→タンパク質→表現型)や遺伝子発現調節の仕組みを学ぶことで、生命科学の面白さに触れ、更に深く学ぶための動機付けとなるだろう。

このため授業の中では、遺伝子組換え実験の原理や実験操作を指導するばかりでなく、対照実験と比較しながら結果を考察する科学実験の基本的な考え方、さらに法律で定められた遺伝子組換え実験の安全管理や廃棄物処理方法についても指導する必要がある。

本研修では、遺伝子組換え実験の原理を概説した後、米国の高校で広く使われている市販教材”Bio-Rad Explorer(旧名称: Biotechnology Explorer)”(Bio-Rad laboratories)を用い、組換えDNA 分子を用いた大腸菌の形質転換実験(遺伝子組換え実験)を実施する。また実験結果の判定、実験の安全管理、廃棄物処理方法ならびに教授方法についても考察する。本実験は、「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確保に関する法律」に基づく「教育目的遺伝子組換え実験」である。これは、2002 年改訂文部科学省「組換え DNA 実験指針」では「教育目的組換え DNA 実験」と規定されたものである。

”Bio-Rad 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、確認テストなどの授業実施に必要な資料が全て含まれている。このキットは、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)に含まれる緑色蛍光タンパク質[Green Fluorescent Protein (GFP)]の遺伝子を大腸菌へ導入することで光る大腸菌を作製する実験系である。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ー(PBAD)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。次に形質転換された大腸菌体内で、GFP 遺伝子を発現させ、GFP タンパク質を作らせる。ここでタンパク質が発現されたかどうかは、この大腸菌に紫外線を当て蛍光により確認する。遺伝子発現調節に必要なプロモーターはアラビノースオペロンのプロモーター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好できたものであるが、実際に授業を組み立てる教員は、キットをただ用いるのではなく、その授業で生徒に何を教えるかを明確にし、授業の流れの中で遺伝子組換え実験を有効に活用することが大切である。

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、本テキストが受講者の教育活動の一助となれば幸いである。

2025 年 7 月 24 日

大藤道衛

目次

1. はじめに p. 3

2. 講義・実習予定 p. 6

3. 遺伝子教育と教育教材 p. 7-12

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” Bio-Rad Explorer”

以下4～7は実習に直接関係する項目である。

4. Bio-Rad Explorer テキストを用いた実習授業の流れ p. 12-14

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議と実習・演習(50 分 x4コマ)

5. 教育目的遺伝子組換え実験の背景と予備知識 p. 14-30

5-1. 遺伝子工学と実習の位置付け

5-2. DNA の構造

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 β ラクタマーゼ(β lactamase)

5-9. pGLO プラスミド DNA 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. プロモーター配列と遺伝子発現

5-12. 大腸菌への遺伝子導入

5-13. 教育目的遺伝子組換え実験に実施に際しての注意点

6. 実験の準備 p. 30-36

6-1. キットの購入

6-2. 器具の準備、試薬・プレートの準備

6-3. 実験台の準備

7. 遺伝子組換え実験(形質転換) p. 37-50
 - 7-1. 実験開始の確認事項
 - 7-2. 実験方法
 - 7-3. 実験のポイント
 - 7-4. 実験結果のまとめ
 - 7-5. まとめのポイント
 - 7-6. 実験結果例
 - 7-7. 実験終了後の廃棄物処理
8. どのような授業をおこなうか p. 51-52
9. 参考図書 p. 53-55
 - 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. 55-72
 - 10-1. プラスミド pGLO の全塩基配列と遺伝子のタンパク質配列
 - 10-2. pGLO プラスミド DNA の起源
 - 10-3. 形質転換効率測定の必要性について
 - 10-4. Luria-Berterni (LB) 培地調製方法
 - 10-5. オートクレーブ以外の滅菌方法
 - 10-6. 組換え DNA 実験における無菌操作とスクレアーゼ
 - 10-7. 実験に用いる水について
 - 10-8. 二段階培養によるスタータープレートの作製

「Bio-Rad Laboratories 社資料(日本語)」

2. 講義・実習予定

1日目

講義:

1. 米国における遺伝子教育
2. 遺伝子組換え実験の基礎知識
3. 教育目的遺伝子組換え実験実施の要点

- 実験原理
- 実験操作のコツ
- 実験操作の注意点
- “Bio-Rad Explorer Kits”テキストの使用方法

実習:

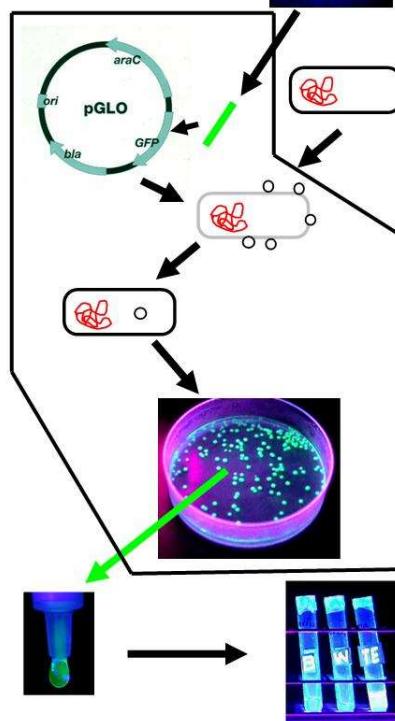
1. 大腸菌への GFP 遺伝子の導入と形質転換
 - 実験開始の準備
 - 形質転換実験



2日目

演習と講義:

1. 形質転換データのまとめ考察
2. 実験の準備方法
 - 実験に必要な機器・器具の準備
 - 培地・試薬の準備
 - 実験台の準備
3. 廃棄物処理方法
 - 使用した器具・プレートの滅菌
4. 遺伝子教育授業の実施方法



実習:

1. 形質転換結果の観察
 - コロニーの観察
 - 紫外線照射による GFP 発現確認
 - コロニー数の測定
2. アラビノースによる GFP 遺伝子発現実験

質疑応答:

3. 遺伝子リテラシー教育と教育教材

3-1. 遺伝子リテラシー教育^{(注)(1, 2)}について

遺伝子リテラシー教育とは、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。生命科学とそれを支える遺伝子工学、ゲノム編集などのバイオテクノロジーは、今世紀の基盤技術である。遺伝子組換え実験を含む生命科学の授業は、これから科学を支える若い人々に生命科学への興味を促すばかりでなく、新聞・テレビなどのメディアを通じた生命科学に関する記事を読みこなし、自ら意思決定するための市民のリテラシーを醸成するために有用である。今後、遺伝子リテラシー教育の重要性は、益々高まってくる。

①生命科学への動機付け教育(中学校・高等学校)

書物の上ばかりでなく、実験を通じ実物に触れ興味を促す教育

②実験を通じて現象を見る教育

対照をおいた実験の組み方、操作方法、データの見方などの実験技術を学ぶ教育

(専門高等学校等での技術教育も含まれる。)

③市民のリテラシーを醸成する教育

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、遺伝子組換え技術やゲノム編集技術により作られた作物や医薬品の受容について自分で意思決定できるためのリテラシーを醸成する教育(科学リテラシー、遺伝子/ゲノムリテラシー)

④高度な生命科学教育

高等学校の教科レベルを超えた先進教育

米国の Advanced placement (AP)

日本のスーパーサイエンスハイスクール(SSH)など

生命倫理を遺伝リテラシー教育に含めることもある。

<参考文献>

(1) Oto M, Ono M, Kamada H.: Gene literacy education in Japan. ~Fostering public understanding through practice of hands-on laboratory activities in high schools~ Plant Biotechnology 23, 339-346 (2006)

(2) 大藤道衛:リテラシーとしての遺伝子教育①「遺伝子教育と米国における動向」 バイオテクニシャン 13, 27-35 (2005)

3-2. 米国におけるバイオ産業の発展と遺伝子教育

遺伝子リテラシー教育を考える上で、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、学術研究・産業における生命科学・バイオテクノロジーの発展に伴い遺伝子リテラシー教育に対する努力がなされてきた。その結果として、生命科学の動機付けの機会が中学校・高等学校で提供されるばかりでなく、市民リテラシーとしての科学教育が学

校教育に取り入れられてきた。このような教育は、若い人たちに生命科学関連の大学・大学院への進学や研究者・技術者への関心を高めるばかりでなく、遺伝子医療・バイオ産業への市民理解 (Public understanding)、市民関与 (Public engagement) を促す素地を醸成する。そこで、早くから遺伝子教育に取り組んでいる米国の事例からバイオテクノロジーの発展とそれに伴う学校教育に取り込まれた遺伝子教育の歴史を眺めてみる。

3-2-1 遺伝子工学技術の進歩と産業の発展

1970 年代初頭の組換え DNA 実験技術の確立から現在までのバイオ技術の進展を眺めてみる。

①1970～1980 年代前半(クローニング・DNA シークエンシングの時代)

遺伝子組換え技術を中心とした遺伝子工学技術が確立し、多くの遺伝子がクローニングされるとともに、バイオ産業への導入が開始され生物製剤が遺伝子組換え技術で生産され始めた。また、遺伝子組換え作物[genetically modified (GM) crop]の研究が始まった。

②1980 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)

遺伝子組換え技術ばかりでなく、PCR や DNA シークエンシングを中心とした解析技術の進展により DNA 鑑定、遺伝子診断・遺伝子治療への応用が始まった。

③1990 年代(多検体同時処理(High throughput:HT)化による網羅的解析の時代)

DNA シークエンシング技術にIT技術を駆使した大規模ゲノム解析技術が確立し多くの生物におけるゲノムプロジェクトが進展した。また、遺伝子組換え作物・食品の実用化がなされた。④2000～(ome または omics の時代)

IT 技術を生かしたバイオインフォマティクスにより複雑な生体物質の状態や相互作用を調べられるようになった。2005 年の次世代シークエンサーの登場は、ゲノム DNA 解析ばかりでなく細胞内で転写された RNA 全体であるトランскルiptオーム(transcriptome)の定量解析も加速した。さらに、発現したタンパク質全体であるプロテオーム(proteome)、細胞内代謝産物全体のメタボローム(metabolome)などを網羅的に解析して得られた膨大なデータを用いて生命をシステムとして捉える試み(システム生物学)がなされ始め、生命科学の新たな展開が始まった。

このように、1970 年代以降、従来の中学校・高校の生物学を超えた新たな生物学の流れが生まれてきた。このような社会の動きに呼応し、1980 年代より米国高等学校における遺伝子教育の取り組みが始まり、生物学の新しい考え方を学校の中に取り込もうという機運が盛り上がった。この教育の背景には、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。

3-2-2 米国高等学校での遺伝子教育の取り組み

①1980 年～:学校の生物学と実社会でのバイオ産業の進歩に温度差

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に存在するギャップの存在を高校教員が感じ取ってきた。「生命科学を目指す人、一般社会人となる人」

全ての人に対するリテラシーとしてのバイオテクノロジー教育／遺伝子教育の必要性から 実社会

とのギャップを埋めるための新カリキュラムを作ろうとする機運が、バイオ産業が発展したカリフォルニアなどの高校教員の中から草の根的に発生した。

②1985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

米国では、高校教員が夏季休暇などをを利用して大学でトレーニングを受ける機会が多々ある。このようなトレーニングの中で Stanford 大学などでは、高校教員の遺伝子教育トレーニングが始まった。更に、高等学校の advanced placement (AP) プログラムに遺伝子教育が取り入れられた。

このトレーニングの中で、高校・大学教員と地域企業との交流(产学共同の機運)がもたれた。

大学研究室と地域企業との連携が数多く見られる大学の中で、高校教員のトレーニングについて、企業の協力が見られた。

③1980年代後半:カリキュラム開発

バイオ技術の発展と遺伝子教育は、生命科学の発展とそれに基づくバイオ技術の推進は「車の両輪」という認識のもと遺伝子教育のカリキュラム開発に対し国が助成が促進され始めた。

④1990年:実験を含む遺伝子教育の推進

初の“DNA SCIENCE”教科書が作成された。また、安全性が確かめられている教材を用いた教育目的の組換え DNA 実験は、研究目的に作られた NIH ガイドラインと無関係であるとの認識で、実験を含む遺伝子教育が推進された

⑤1995年

DNA SCIENCE が”National Science Education Standards”に掲載

この Standard は、日本の指導要領と異なりガイドラインである。このため教員はこの Standard を参考とし様々な教材を作成し独自の授業を展開している。

充実した生物学教科書が多数出版されてきた。DNA 抽出などの実習が盛り込まれているも、AP プログラム対応のテキストなどもある。

Bio-Rad laboratories 社が遺伝子教育教材キット”Biotechnology Explorer system”(Stanford Univ. 共同開発)を開発し β 版の販売開始。(本格的な販売は 1997 年以降)

このように米国での遺伝子教育の発展には、高校(高校教員)、大学、企業との連携ができる素地があった。このため、高校生に対する大学・企業での様々な研修プログラムも行われている。

3-2-3 米国の遺伝子教育(大学・企業連携)事例

①University of Illinois College of Medicine at Rockford(イリノイ大学 医科大学 ロックフォード校)

Thermo Fisher Scientific 社(旧:Pierce Biotechnology)と共同で学生のインターンシッププログラムを 1992 年より実施している。夏休みを利用して、高校生が大学・企業にて、また大学生は企業にてインターンとして研究に従事する。3 ヶ月間の成果を審査員が審査して、優秀者を表彰する。

テーマは、企業・大学研究室テーマの一部に関わる。例えば、アッセイ法の開発・現製品の改良等夏休み 3 ヶ月で実施できる内容である。短期間での研究であるため、審査基準は、研究の新規

性(10%)、実験内容の把握と結論の妥当性や今後の展望(50%)、プレゼンテーション能力(40%)である。審査員は、大学教員、企業研究者などが担当する。インターン終了時(8月)に行う発表会(Summer Science Forum: SSF)には、指導教員(メンター)、高校教員、参加者の保護者、大学院生、大学教員、審査委員が参加しディスカッションにも参加する。発表は口頭発表、ポスター発表が行われ、さらに審査員からの口頭試問が行われる。



2014 年の事例:左上(参加した高校生)、右上(会場での口頭発表)、右下(ポスター発表)、左下(

高校生⇒大学・企業
大学生⇒企業

＜参考文献＞

大藤道衛:米国における実践的な生命科学教育① 高校生のインターンシッププログラム～バイオテクニシャン(日本バイオ技術教育学会誌) 23, No. 2, 44-55 (2015)

②Bay Area Biotechnology Education Consortium (BABEC)

1996 年に設立された米国サンフランシスコ湾周辺の大学・企業・学校教育機関が連携したコンソーシアムである。学校教員向け、高校生向けワークショップ実施している。ワークショップのカリキュラムには、本研修会で扱う GFP 遺伝子を用いた大腸菌の形質転換(遺伝子組換え実験)、ならびに PCR 電気泳動によるヒト遺伝子解析なども含まれる。バイオ・ラッド ラボラトリーズのキットも活用したワークショップが展開されている。

3-3. 米国の遺伝子教育教材 “Bio-Rad Explorer program”

遺伝子教育を実施する際、教材開発は大きな負担となる。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、多くの特徴をもち高いシェア-をもつ教材が、”Bio-Rad Explorer program(旧:Biotechnology Explorer program)” (Bio-Rad Laboratories 社製品)である。このキットは、分子生物学研究に関わる多くの実験手法(図 1)が含まれて、よく工夫された構成である。この教材は、Stanford 大学の高校教員教育プログラムを参考に、元高校教員であった Bio-Rad Laboratories の Ron Mardigian 氏が教材化したプログラムである。いくつかの製品は米国の advanced placement (AP)プログラムに対応している。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先生用ならびに生徒用マニュアル、理解度確認の練習問題が含まれている。

“Bio-Rad Explorer™ program”

形質転換(遺伝子組換え実験): pGLO™ Bacterial Transformation kit

発現タンパク質の精製(遺伝子組換え実験): Green Fluorescent Protein Chromatography kit

クローニング(組換え DNA 実験): Secrets of the Rainforest kit

クローニングから DNA シークエンシング: Cloning and Sequencing Explorer Series

電気泳動による DNA 解析: Lamda DNA kits

PCR: Real-Time PCR kit

DNA 鑑定: Forensic DNA Fingerprinting kit

PCR と DNA 鑑定: PV92 PCR Informatics kit, Crime Scene Investigator PCR Basics™ kit

ゲルろ過: Size Exclusion Chromatography

タンパク質解析(タンパク質の定量): Got Protein?™ kit

タンパク質解析(電気泳動、ウエスタンブロッティング): Comparative Proteomics kit I, II

ヒトゲノム DNA 抽出: Genes in a Bottle™ kit

免疫化学: ELISA Immuno Explorer™ kit

遺伝子組換え作物(GMO): GMO investigator™ kit

微生物培養: Microbe and health kit,

酵素実験: Biofuel Enzyme kit

[線虫の走性:C. elegans behavior kit(米国内のみ発売)]

[光合成: Photosynthesis and Cellular Respiratory kit(米国内のみ発売)]

[ゲノム編集: Out of the blue CRISPR kit(米国内のみ発売)]

[COVID-19 教材: COVID-19 Teaching Resources]

注: 予告なくキット番号の変更、新製品が追加されることがある。

Bio-Rad Explorer URL: <http://explorer.bio-rad.com>

(地域指定で日本語版に移行)

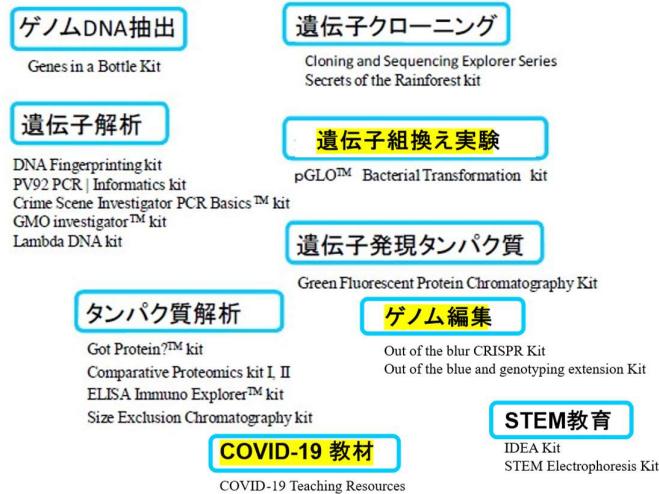


図1 遺伝子工学技術に関する教育教材キット(2022年現在)

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。

STEM: Science, Technology, Engineering & Mathematics(科学、工学、技術、数学)

遺伝子教育教材キットを使用することで、実習が実施できる。これらのキットは米国の AP プログラム用に設計されているため、練習問題の内容など日本の授業にそぐわない場合もある。日本で使用する際、教員自身が教えたい内容に適するようにキットの実験を取り込む必要がある。

下記に遺伝子教育用キットを用いる場合のメリットを挙げてみる。

- 必要な試薬・器具が含まれている。
- 容易な操作で実習できる。
- 個別の試薬購入に比べ、比較的安価である。
- 学習目標を自由に設定できる。

本研修では、Bio-Rad Explorer “pGLO™ Bacterial Transformation kit”を用いた形質転換実験を行う。以下4～7項には、キット内容、実験の背景・原理、実験準備、実験方法、廃棄物処理を示す。

- Bio-Rad Explorer キットを用いた実習授業の流れ^(注1)

“pGLO™ Bacterial Transformation kit”(pGLO バクテリア遺伝子組換えキット(キット1))を用いた教育目的遺伝子組換え実験の流れをまとめてみる。

pGLO バクテリア遺伝子組換えキット:BioRad Explorer Kit 1(カタログ No.166-0003JEDU)

製造:Bio-Rad laboratories Bio-Rad Explorer URL: <http://explorer.bio-rad.com> (地域指定で日本語版に移行)

、日本での販売:バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)^(注2) 注 1:同社「pGLO バクテリア遺伝子組換えキット」に添付されている説明書に基づき記載している。しかし、同社の説明書は予告なく変更されることがあるため、キット購入時のもので確認する必要がある。注 2:旧社名は、日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社(2007年5月まで)

4-1. 形質転換授業準備(約 3 時間)

授業開始前々日に試薬・器具の準備ならびに先生用、生徒用マニュアル当該箇所の確認を行う。

先生用マニュアル：

①実習の試薬・器具準備

必要な試薬・器具一覧、実験開始前の準備一覧

寒天プレートの準備(写真入)、スタータープレートの準備・試薬調製

②遺伝子組換え原理・実験原理・操作方法について講議・実験のポイント確認

形質転換と遺伝子組換え

このキットを使用するにあたってのポイント

生徒用マニュアルの問題と答え(先生用)

先生用実験操作簡易説明「クイックガイド」⇒これを読むと実験の全体が簡単に掴める。

付録内容 A:バイオテクノロジーの歴史、B:このキットに出てくる用語の解説、C:分子生物学の基礎と用語、D:発現調節、E:参考文献、F:教育目的遺伝子組換え実験実施における注意事項

生徒用マニュアル：

Lesson ごと解説・操作方法、練習問題で構成されている。

Lesson 1 遺伝子組換えについて、質問

Lesson 2 遺伝子導入実験、質問

Lesson 3 データの収集と分析、質問

Lesson 4 考察

4-2. 遺伝子組換えについての講議と実習・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(講議)

下記の 5 項目を盛り込んだ講義。

① 組換え DNA 実験と原理(宿主・ベクター)

② 組換え DNA 実験の規則(実験室・滅菌方法)

③ 実験の結果評価方法

④ 遺伝子発現とセントラルドグマ(DNA>RNA>タンパク質>形質)

⑤ 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)

pGLO による形質転換・培養を行う。

3コマ目 (Lesson 3) : データの収集と分析(演習)

コロニーの有無、蛍光観察によりを、発現調節の仕組みを考える。(定性的分析)

4コマ目 (Lesson 4) : 考察(演習)

結果を比較するとともに形質転換効率を測定し評価する。(定量的分析)

注:ここでいう「講議」・「実習」・「演習」とは、

講議: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

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ろうか？

生命現象の解明は、20世紀前半では細胞・組織レベルで行なわれ、組織・細胞の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、細胞内に存在するタンパク質の種類は、数千から数万と多く、更に20種類のアミノ酸配列により複雑な立体構造を形成するため、タンパク質の解析は、困難を極めた。また、タンパク質の種類によっては、存在量が少なく抽出精製自体が困難なものもあった。このため、タンパク質自体を取り出すのではなく、DNAを取り出し、タンパク質の情報を持つ遺伝子を解析する方が、容易と考えられた。遺伝子組換え技術が開発された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(図2)。

このように、遺伝子工学は、機能を持つタンパク質解析の近道(突破口)としてタンパク質の情報をもつ遺伝子をクローニングおよび解析に貢献した。一方、DNA解析技術は、病気に関係した遺伝子の変異・多型解析による遺伝子診断やDNA上に多数存在する繰り返し配列の繰り返し数測定やミトコンドリアDNA解析を利用した法医学における個人鑑定などその手法自体が実用的な分野に利用されている。

細胞・組織の形態解析(細胞生物学)

細胞機能を調節しているタンパク質解析(タンパク質化学)
全てのタンパク質解析は困難: 1950-60年代

タンパク質の情報を持つ遺伝子の解析(遺伝子工学)
ゲノムシークエンシング: デジタル情報としての解析

1980-90年代

タンパク質の網羅的解析(プロテオーム:タンパク質解析)
タンパク質間相互作用解析 2000年~

細胞・組織の解析(フェノーム:システムとしての細胞)
デジタルからアナログ的機能解析へ

図2 生命科学の発展と遺伝子工学の位置付け

生命科学は、細胞を見る学問から、分子レベルへと移行した。タンパク質の構造を調べることから更に遺伝子工学による遺伝子のクローニング、DNA シークエンシング、更には、次世代シークエンシング技術やイメージング技術により網羅的に得られた細胞内分子の膨大なデータベースに基づき細胞全体をシステムとして捉える方向へ進んでいる。

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移す遺伝子導入、更に遺伝子の変異・多型解析、DNA の塩基配列を決める遺伝子解析がある(図3)。これらの実験のうち、いわゆる遺伝子組換え実験(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。

Bio-Rad Explorer キットでは、オワンクラゲに含まれる蛍光タンパク質(green fluorescent protein: GFP)の遺伝子を大腸菌のプロモーター配列をもつベクターに組み込んだ組換え DNA 分子を大腸菌に導入し大腸菌を形質転換する。この際、培地に発現誘導物質を加えることでこの大腸菌内で GFP が発現したことを紫外線照射による GFP の蛍光により確認する。

このキットを用いた授業では、遺伝子組換え実験の原理と操作方法、実験を実施する際のきまりごと、対照実験(コントロール実験)とに比較による実験の結果評価方法、遺伝子発現とセントラルドグマ、発現調節の仕組みなどを幅広く学ぶことができる。

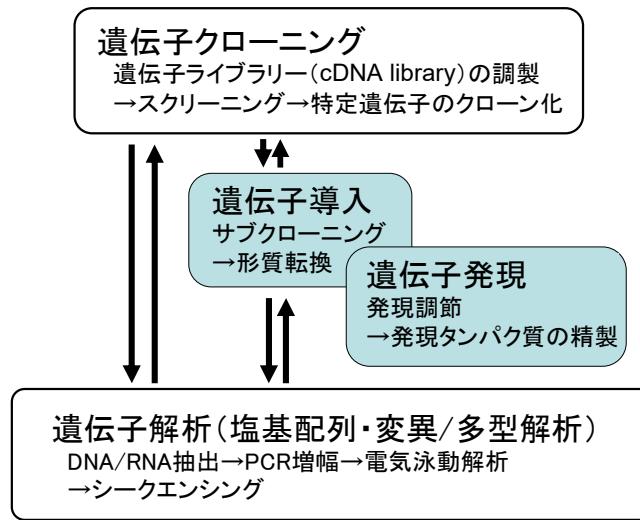


図3 遺伝子工学実験の全体像

遺伝子工学実験は、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、遺伝子解析に分けられる。

5-2. DNA の構造

DNA は、デオキシリボースという糖にアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)という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なっている。このため塩基の並び方(塩基配列)を遺伝暗号ということもある。

分子構造はヌクレオチドの繰り返し構造(図4)であるため、複雑な立体構造をとるタンパク質にくらべ解析しやすい利点がある。2重らせんの形成に当たっては、塩基分子内にあるOとHまたはNとHの間で水素結合が形成される。その結果、GとC (水素結合 3本)、AとT (水素結合 2本)が、対となって結合する(赤矢印にて表示(図 4))。ここでは水素結合が3本ある GC の含量はDNA2重らせんの熱安定化に寄与しており、DNAを扱う実験の種類によっては GC 含量に注目する場合がある。一方、リン酸は中性水溶液中でマイナスチャージ(電荷)を帯びているため、DNAを分離・分析する際には、電気泳動が有効である。

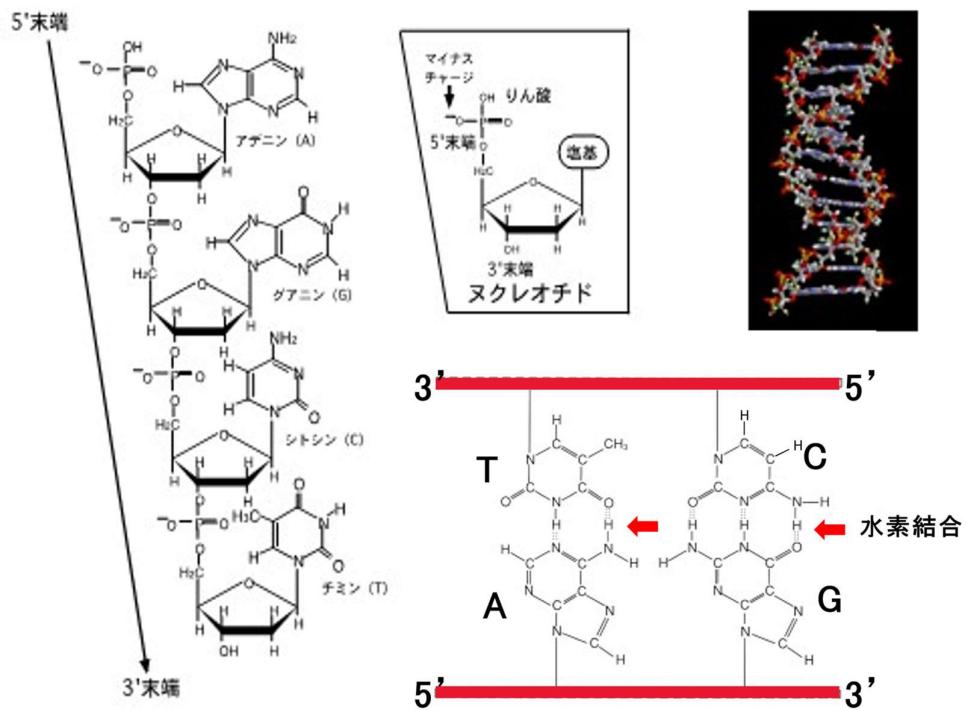


図4 DNA の構造

DNA には、糖に含まれる C(炭素)の番号により方向付けられている。これは、リン酸が結合している 5' 方向と OH 基が存在する 3' 方向である。DNA は DNA の最小スクレオチド単位を 1 base pair (bp: 塩基対)といい、幅 2 nm で長さが約 0.3 nm である。

5-3. セントラルドグマとコドン表

遺伝情報は、DNA から RNA に転写され、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全ての生物に共通である。この流れに沿って、遺伝情報は機能をもつタンパク質へ細胞内で作られていく(図5)。

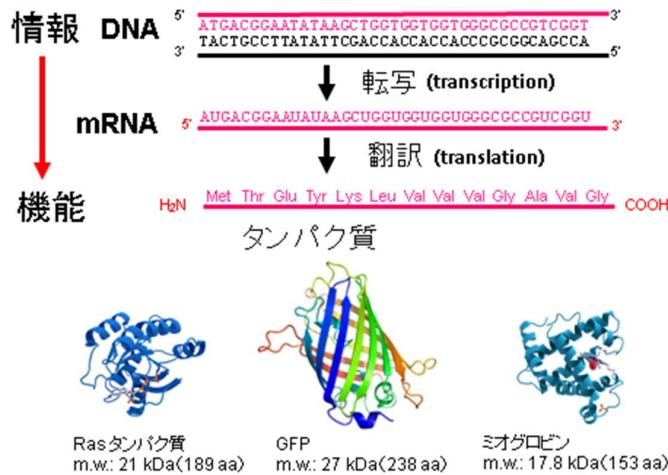


図5 セントラルドグマ

DNA 上に載っている遺伝情報は、RNA ポリメラーゼにより RNA に転写される。ここで RNA もまた情報を担う分子だが、T の代わりにウラシル(U)をもっている。RNA からリボソーム上で翻訳が行われアミノ酸が連結してタンパク質が作られる。なお、タンパク質はアミノ酸が連なった高分子(1 次構造)が、折りたたまれ(フォールディングされ)高次構造を形成する。図中のタンパク質グラフィックは、wikipedia より引用。

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	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	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

表1 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 RNA に転写された後、アミノ酸に翻訳される。コドン表は、この遺伝暗号解読表である。(コドン表では、RNA で表しているため塩基は AGCU で示されている。) このコドン表は、基本的には全ての生物に対し共通である。

5-4. 遺伝子組換え実験(組換えDNA実験)

異なる生物由来のDNAをプラスミドDNAなどのベクターDNAに結合させた「組換えDNA分子」を細胞内に導入することで新たな形質が加えられた生物が生まれる。このように「組換えDNA分子」を用いた新たな生物個体を作出する実験を「遺伝子組換え実験」という。ここで大腸菌を用いた実験を考えてみる。まず、cDNAライブラリーのクローンから目的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(ここでは大腸菌)に導入することで、「組換えDNA分子」をもつ細胞ができる。ベクターDNAのプロモーター領域の下流にコドンの塩基配列を合わせて目的遺伝子を組み込むと、宿主細胞のタンパク質合成系を用いて導入された遺伝情報に従った組換えタンパク質が合成される。その結果、細胞内で新たに合成されたタンパク質(組換えタンパク質)により大腸菌の形質が変化するため形質転換という。(ここで大腸菌は単細胞であるため「細胞(菌体)=個体」である。)

種を超えて遺伝子組換え実験ができる前提是、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)も生物種を超えて基本的には、共通であることによる。

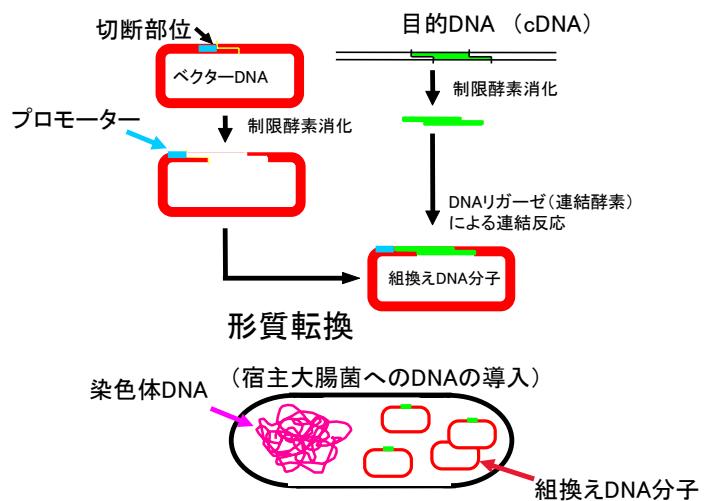


図6 大腸菌を宿主とした組換えDNA実験

ベクターDNA(遺伝子の運び屋)としてプラスミドDNAを、宿主として大腸菌を用いた場合を示している。

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 (図7)。制限酵素は、現在までに 1,000 種類以上が見つけられ、100 種類以上がメーカーから市販されている。

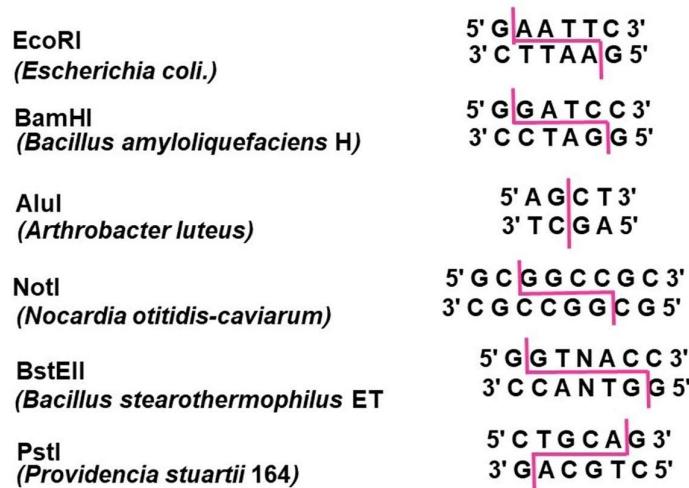


図7 制限酵素

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 (パリンドローム: palindrome) 構造を持っている^(注)。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。酵素の名前は、属名および種名の最初の 2 文字を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 (blunt end) がある。注: パリンドローム構造をとらない配列を認識する制限酵素もある。

連結酵素

2 本の異なる DNA 鎖の 3'-OH と 5'-リン酸基を、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 (図8)。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使用できる。これらの酵素も各メーカーから市販されている。

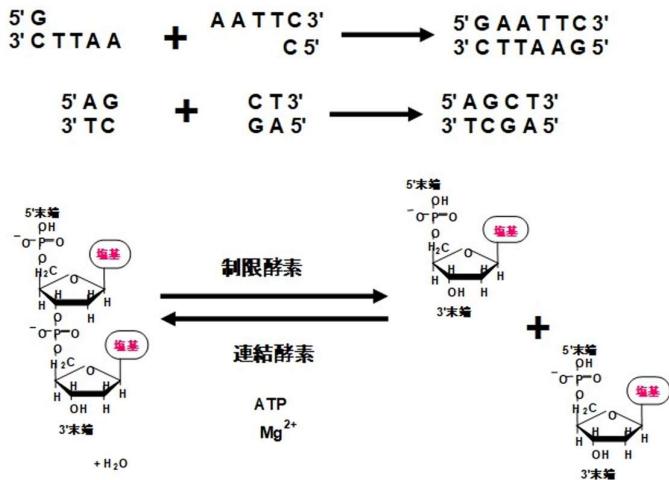


図8 連結酵素反応

連結酵素は、付着末端、平滑末端いずれも連結することができる。よく用いられる連結酵素に大腸菌由来 DNA リガーゼがあるが、平滑末端の連結反応効率は低い。一方、T4 DNA リガーゼは、平滑末端の連結反応も効率よくおこなうことができる。なお、この反応はエネルギーを必要とするため、ATP が必要である。

5-6. Green Fluorescent Protein (GFP) ^(注1)とは

GFP は、発光オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) ^(注2) (図9A) 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。これは紫外線を当てるとき照射された光のエネルギーの一部を熱として、残りの多くのエネルギーを蛍光と放出するためである。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)。 (図9B)。GFP は、238 個のアミノ酸からなる分子量約 27(27,000)kDa の籠状タンパク質である。GFP を構成している 3 つのアミノ酸が発色団を形成している(図9C、巻末<参考>参照)。

注1: GFP の発見者である下村脩博士は、「緑色蛍光タンパク質 (GFP) の発見と開発」によって、マーティン・チャルフィー博士、ロジャー・Y・チエン博士とともに 2008 年にノーベル化学賞を受賞している。

注2: オワンクラゲの学名は、*Aequorea aequorea* または *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)。

注3: $E = Nhc/\lambda$: 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)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)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 (6.02×10^{23})、h: プランク定数 (6.626×10^{-34} J·s)、c: 光速 (3×10^8 m/s)

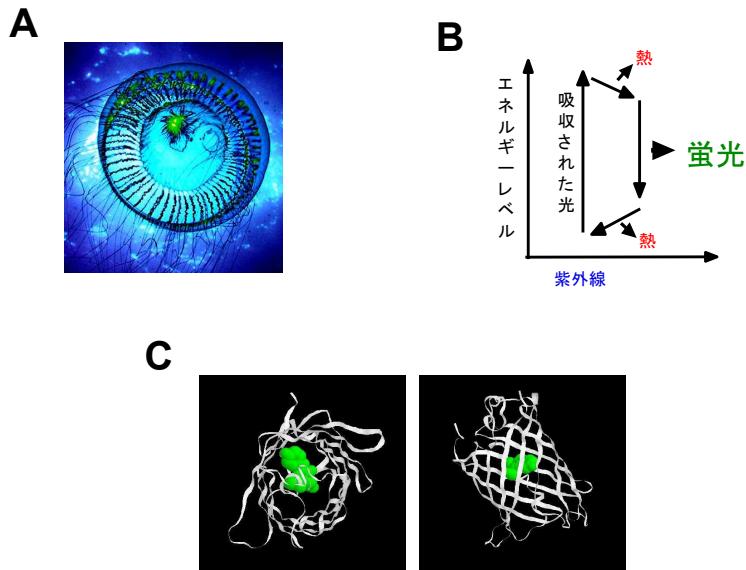


図9 蛍光タンパク質 GFP の構造と性質

A:オワンクラゲ、B:紫外線照射と蛍光、C:GFPの立体構造(3アミノ酸で発色団を形成している。)

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 遺伝子ならびに選択マーカー遺伝子として抗生素アンピシリンを分解する酵素(β ラクタマーゼ)の遺伝子(*bla*)を含む総塩基数 5371 bp のプラスミド DNA(組換え DNA 分子)である(図10)。このプラスミド DNA には、更に GFP 遺伝子の発現調節を行うために、アラビノースオペロンのプロモーター(PBAD)配列および PBAD に結合し発現調節に関与するタンパク質(Ara C)の遺伝子 *ara C* が含まれている。このプラスミド DNA が導入された大腸菌を、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:

プロモーターとは、RNA ポリメラーゼが結合することである。

β ラクタマーゼ(β lactamase、Beta lactamase)は、アンピシリナーゼ(ampicillinase)ということもある。

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

ori とは、大腸菌内で複製できる複製開始点である。

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、Ara C: Ara C タンパク質 *araC*: Ara C タンパク質の遺伝子

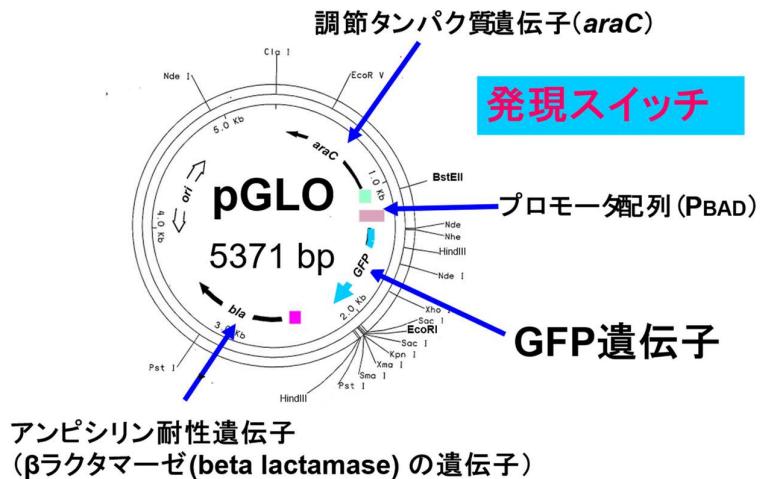


図10 pGLO^(注)プラスマドDNAの構造(含:制限酵素地図)

p:plasmid, G:GFP, L: β Lactamase, O: ori

注:pGLOの発音:ピージーエルオーもしくは pglow (ピーグロウ)と発音、光る(glow)タンパク質の遺伝子を持つプラスマドの意味:

Ron Mardigian (Bio-Rad laboratories)氏が命名、塩基配列などの詳細は、巻末<参考>に記載

5-8. アンピシリン(Ampicillin)と β ラクタマーゼ(β Lactamase, Beta-lactamase)

アンピシリンはペニシリン系の抗生物質で β ラクタム構造と呼ばれる4員環を持つことから β ラクタム系抗生物質と呼ばれている。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良く似ている(図11)。このため、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関与するトランスペプチダーゼが類似体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に弱くなり、数回の細胞分裂の末、浸透圧に耐えられなくなり溶菌して死滅する。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ことでアンピシリンを失活させる(図12)。目的遺伝子をプラスマドベクターに組込み形質転換を行う場合、 β ラクタマーゼ遺伝子を含むベクターを用いると、アンピシリンを含む培地で培養した場合、プラスマドDNAが導入されたバクテリアが生育でき、組換え大腸菌を選び出すことができる。このようにアンピシリン耐性遺伝子(amp^r)とも呼ばれる β ラクタマーゼ遺伝子(Bla)は、遺伝子組換え実験の選択マーカーとして利用されている。本実験のpGLOプラスマドにも β ラクタマーゼ遺伝子が含まれている。

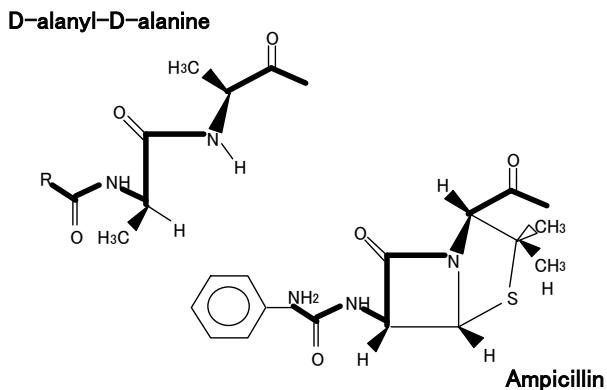


図11 D-アラニル D-アラニンとアンピシリンの分子構造

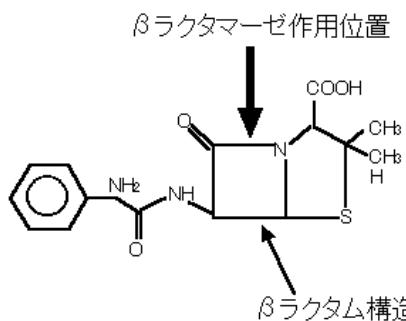


図12 アンピシリン^(注)の分子構造とβ ラクタム構造

注:アンピシリンはアンピシリンナトリウムの粉末として市販されており、冷蔵庫中で遮光保存する。アンピシリンは熱に弱いので培地調製ではオートクレーブした培地の温度が下がってから添加する。また、培地中の溶解したアンピシリンは不安定である。このため、培地を調製後、室温で1週間ほど放置すると失活することがある。このためアンピシリンを含む培地を長期保存する場合は、2~4°C保存することを勧める。

5-9. pGLO プラスミド DNA 導入大腸菌(K12 株、HB101)におけるタンパク質の発現

本実験は、pGLO プラスミド DNA(図6)を、遺伝子組換え実験で広く用いられている大腸菌 K12 株由来 HB101に導入する形質転換(transformation)である。GFP 遺伝子を含む pGLO プラスミドを大腸菌に導入し形質転換した場合、GFP ばかりでなく Beta-lactamase(β ラクタマーゼ)やアラビノースオペロンのプロモーター領域に結合するタンパク質も発現される(図13)。形質転換した大腸菌は、Beta-lactamase が発現してい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、機能には結びつかない」ということである。

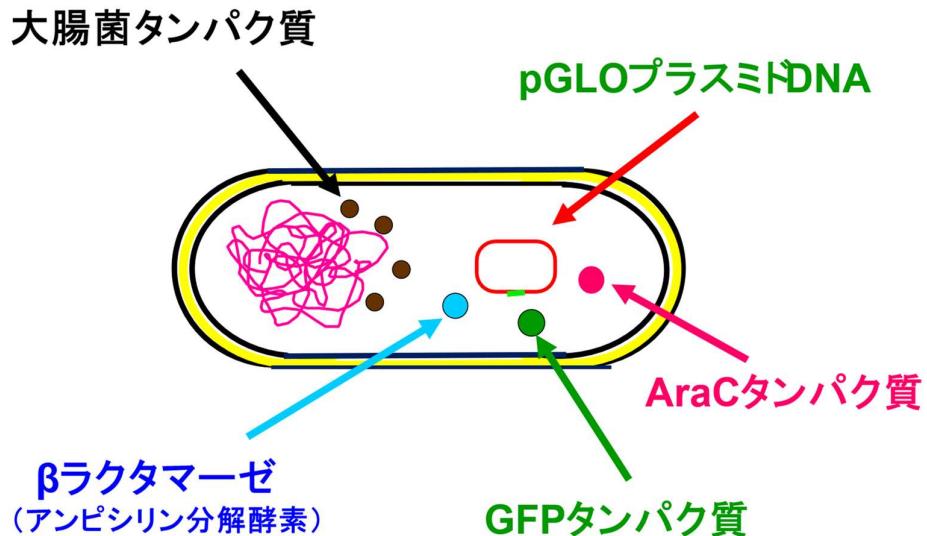
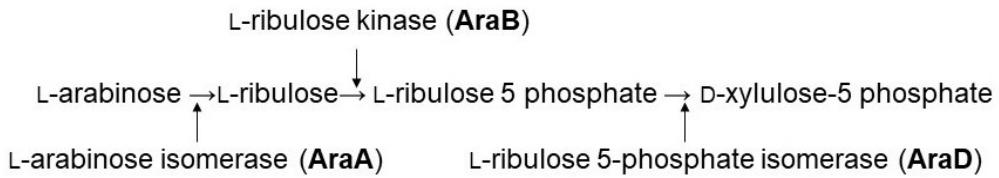


図13 pGLO プラスミド DNA 導入大腸菌でのタンパク質発現

大腸菌体内にはゲノム DNA に含まれる遺伝子から発現されたタンパク質に加え、導入した pGLO プラスミド DNA に含まれる遺伝子から発現されたタンパク質が存在する。

5-10. 大腸菌アラビノースオペロンと遺伝子発現調節

アラビノースを代謝系に取り込む酵素の遺伝子群を含むアラビノースオペロンには、酵素の遺伝子である *araB* (L-ribulose kinase の遺伝子), *araA* (L-arabinose isomerase の遺伝子), *araD* (L-ribulose 5-phosphate isomerase の遺伝子) およびプロモーター配列である P_{BAD} が存在する。(図10)。これら3種類の遺伝子が発現することでアラビノースをペントースリン酸経路に取り込み代謝することができる。



アラビノースオペロンの遺伝子発現調節は、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 配列に結合し RNA ポリメラーゼのプロモーター配列への結合を妨げている（負の制御）。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（正の制御）。このような仕組みにより AraC タンパク質は、*araB*, *araA*, *araD* という 3 つの構造遺伝子の発現を調節している（図14）。

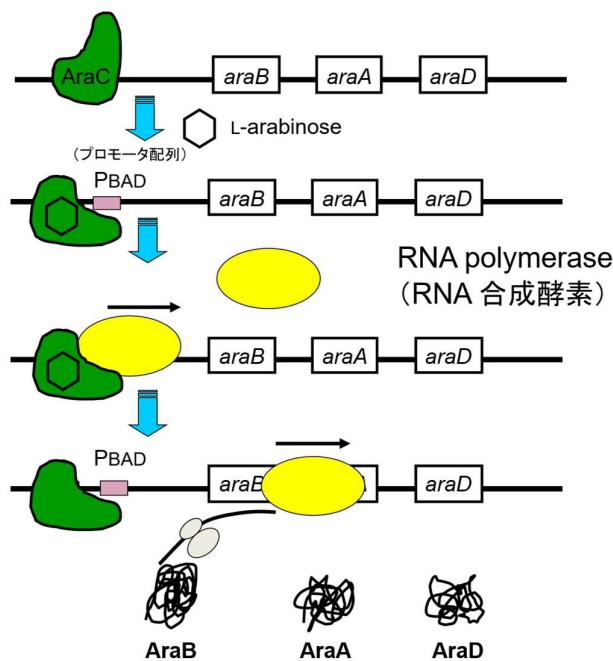


図14 アラビノースオペロンと遺伝子発現調節

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。このためアラビノースオペロンでの発現調節同様に GFP の発現は、AraC タンパク質にアラビノースが結合することにより行われている。pGLO プラスミド DNA により形質転換された大腸菌では、培地にアラビノースを加えるか否かにより GFP の発現を調節することができる（図15）。

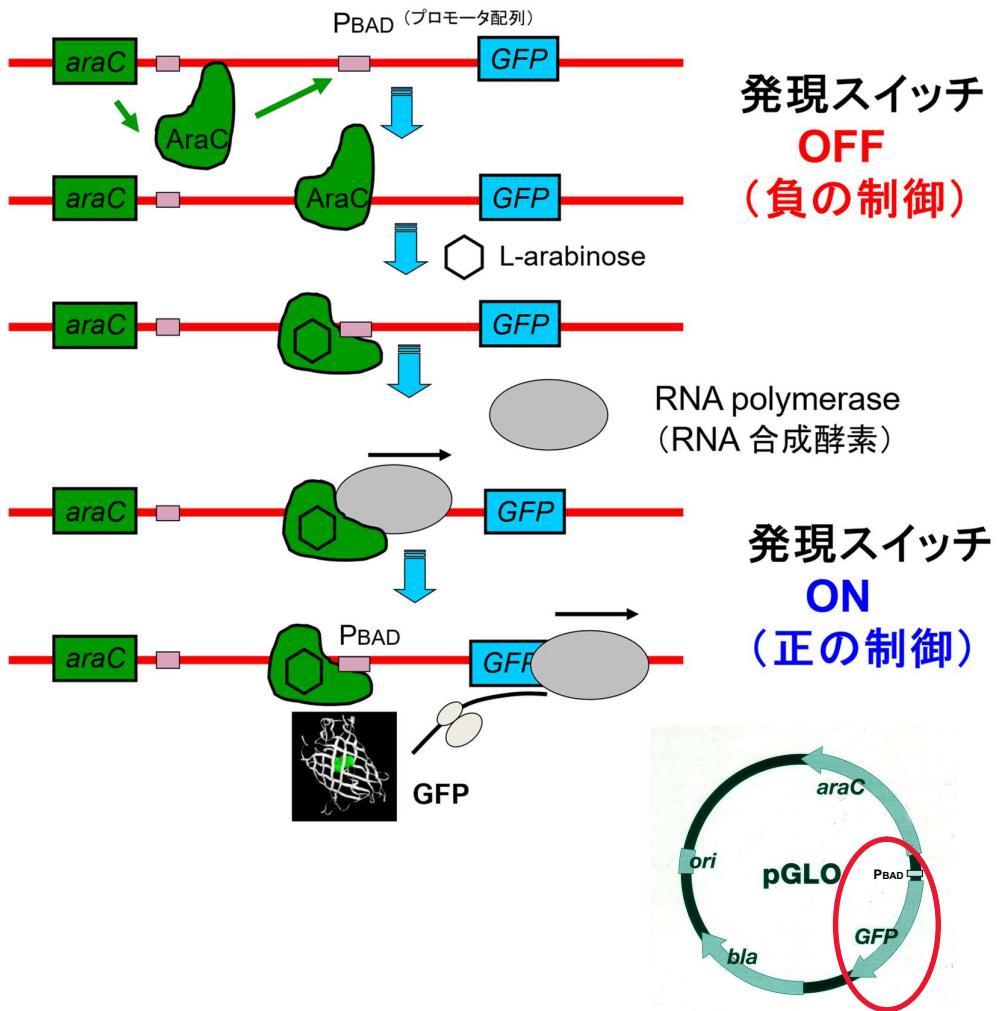


図15 pGLO プラスミド DNA におけるアラビノースによる GFP 遺伝子発現調節

5-11. プロモーター配列と遺伝子発現

生物種によりプロモーター配列や調節遺伝子は異なっている。実験では、大腸菌のプロモーター配列 *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、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ー配列も異なるためである。このため、大腸菌プロモーター配列をもつベクターに組み込んだ GFP 遺伝子は、大腸菌のみで発現できる。一方、植物細胞で有効なプロモーター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。動物細胞でも同様である(図16)。

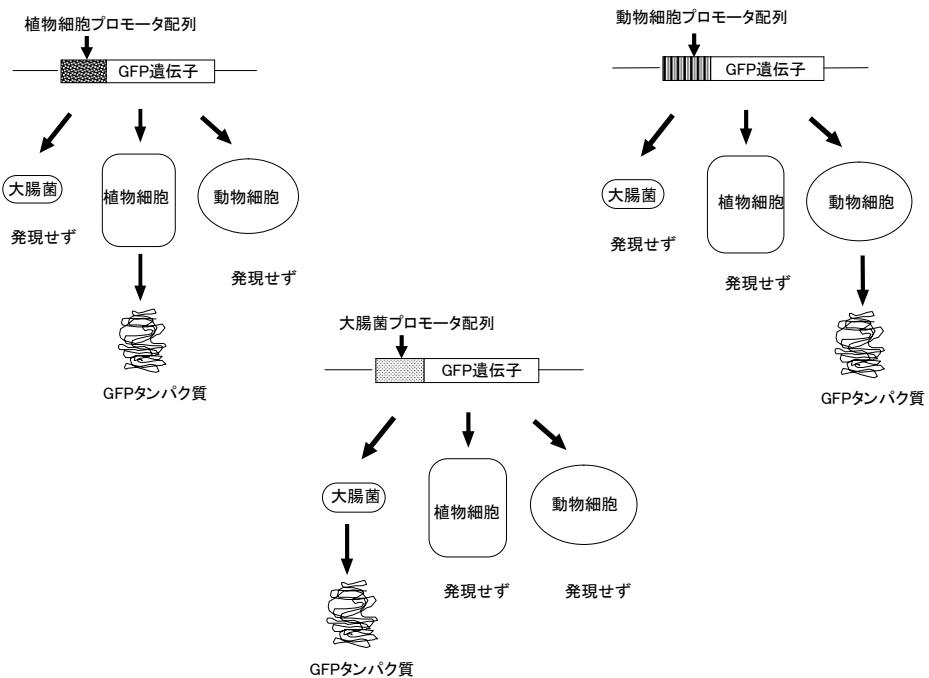


図16 生物種とプロモーター

RNA ポリメラーゼが結合するプロモーター配列は全ての生物共通ではない。また、生物種により様々なプロモーター配列がある。このため遺伝子が導入させた場合、導入細胞で活性をもつプロモーターがなければ遺伝子は発現しない。

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 DNA のような大きな分子は菌体内部に取り込めない。大腸菌を 50 mM の CaCl₂ 処理することによりプラスミドを取り込みやすい細胞(コンピテント細胞: competent cells)を調製することができる。

このようなコンピテント細胞とプラスミド DNA を混合すると、プラスミド DNA はコンピテント細胞表面に吸着した後^(注)、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。「pGLO バクテリア遺伝子組換えキット」に含まれる「形質転換用緩衝液(Bu)」が、「50 mM CaCl₂ 溶液」である(図17)。

注:2価である Ca²⁺イオンによりプラスミド 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 DNA が細胞表面に吸着しやすくなる可能性もあるが詳細なメカニズムは不明である。

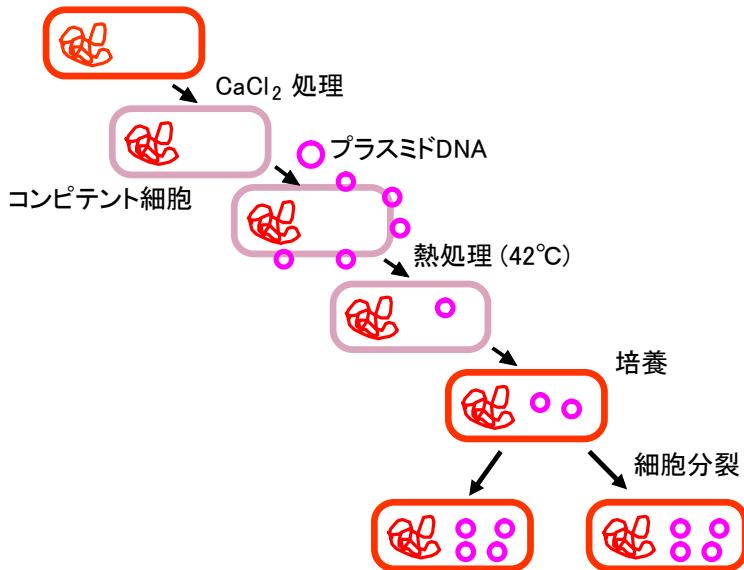


図17 コンピテント細胞の作製(CaCl₂法)と形質転換

対数増殖期の大腸菌をCaCl₂溶液に加えることで大腸菌はプラスマドDNAを取り込みやすい細胞(コンピテント細胞)になる。このコンピテント細胞とプラスマドDNAを混合し、42°Cで熱処理することでプラスマドDNAは大腸菌内(細胞内)に導入される。

5-13. 教育目的遺伝子組換え実験に際しての注意点

実験申請手続きを行い、教育目的遺伝子組換え実験を行うに際しては、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。

注意事項の原則は、「実験系への雑菌のコントами(混入)を防ぐ、DNase^(注)のコントами(混入)を防ぐ、組換え体を実験室外に出さない。」

- ① 実験前に、ドアを閉めて実験中閉鎖系とする(物理的封じ込めP1とする)。
- ② 実験室内では靴の履き替え白衣の着用することが望ましい。
- ③ 実験前および実験後に、必ず手を洗う。(実験前:実験系への異物、雑菌のコントамиを防ぐ、実験後:実験室の菌や試薬が外部に移行しないようにする。)
- ④ 実験台に70%エタノール溶液を噴霧し殺菌してから使用する。実験終了後も殺菌する。
- ⑤ 培地調製で使用する水は、蒸留水、イオン交換水以上の水を用いる(68ページ、10-7参照)。
- ⑥ 使用する器具、試薬は、予め全て滅菌する。(キットの試薬は、滅菌済みだが、培地は滅菌しなければならない。)
- ⑦ プラスマドDNAを扱う場合は、会話を避け唾液からのDNaseの混入を避ける。
- ⑧ 使用した菌、器具、試薬は、全てオートクレーブもしくは準じた方法にて滅菌後、廃棄する。
- ⑨ 紫外線を使用する際には、紫外線を直視しない。(ゴーグルを使用して目を保護する。)

注:DNA 分解酵素

DNA は物理化学的に安定な物質であるが、Mg²⁺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. 実験の準備

教育目的遺伝子組換え実験を行う際、始めに実験申請手続きを行い、実験準備に入る。

(準備方法は、キットのマニュアルに記載されている。)

<滅菌について>

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、実験後は、組換え大腸菌が付着する可能性のあるものは、全て同様に滅菌する。

滅菌方法として主に用いる方法は、オートクレーブ滅菌である。

6-1. キットの購入

pGLO バクテリア遺伝子組換えキット(Bio-Rad Explorer Kit 1:カタログ No.166-0003JEDU)

製造:Bio-Rad laboratories: <http://www.bio-rad.com>

販売:日本にあるバイオ・ラッドラボラトリーズが販売している。教材等の代理店を通じて購入する。

6-2. 器具の準備、試薬・プレートの準備

このキットは、8 実験用である。このため、8 名(1人1実験)、16 名(1班 2 名)、24 名(1班 3 名)、32 名(1班 4 名)で実習を実施できる。

6-2-1. キット以外に必要な共有器具

① オートクレーブ:培地調製、廃棄物処理

代用品

培地調製→電子レンジ

廃棄物処理→圧力釜

② 42°C インキュベータ(水浴):ヒートショック

代用品 42°C の温水

実験時に 42°C(プラスマイナス 1°C 程度)になるように湯を用意する。多少温度が変わっても効率は変化するものの形質転換は起こる。

③ 37℃インキュベータ(空気循環型):バクテリアの培養
代用:室温で長時間培養(24~48時間)

④UVランプ(長波長 366 nm):蛍光検出
代用品:ブラックライト

6-2-2. 1 グループに配布する試薬・器具等

- | | |
|--|---------------|
| ① スタータープレート(大腸菌 HB101) | 1 プレート |
| ② 寒天培地プレート
(LB 1枚、Lb/amp 2枚、LB/amp/ara 1枚) | 4 プレート |
| ③ 形質転換用溶液(Transformation buffer: "Bu") | 1 本(約 0.8 mL) |
| ④ LB (Lysogeny Broth, Luria-Bertani) 液体培地 | 1 本(約 0.8 mL) |
| ⑤ プラスミド DNA 溶液
(容量が少ない場合、ループで採取できなくなるため、2グループで1本) | 2 グループで 1 本 |
| ⑥ ループ | 1 袋 |
| ⑦ 使い捨てピペット(スポット) | 5 本 |
| ⑧ チューブラック | 1 |
| ⑨ アイスボックス(発泡スチロール空き箱) | 1 |
| ⑩ マーカーペン | 1 |
| ⑪ 廃棄物ゴミ箱 | 1 |
| ⑫ はさみ | |
- ⑩ ⑫ はキットに含まれていない。

6-2-3. 寒天培地の作製 (8 実験分)

使用する水:蒸留水、イオン交換水が望ましい。

滅菌方法:ガラス製三角フラスコに水を加えた後、培地パウダーを添加し塊ができるないように攪拌する。攪拌後、オートクレーブ(121℃、20 分)^(注)にかけることで溶解ならびに滅菌ができる(図18)。オートクレーブの準備ができない場合、電子レンジで代替可能である。ガラス製三角フラスコに培地を加え、電子レンジ中で十分に沸騰させる必要がある。十分という意味は、「ぐつぐつ」沸騰してから数分間、沸騰を続けることである。

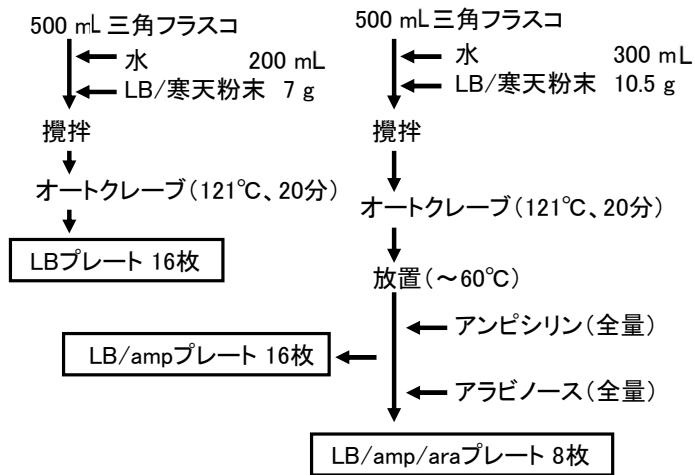


図18 培地作製方法

注:オートクレーブ滅菌(121 °C、15-20 分)

バクテリアの培地滅菌に用いる高压蒸気滅菌。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使う。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(製品によっては不可)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°C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。また、抗生物質などの熱に弱い成分を含む溶液の場合、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。

培地の分注に際して、プレートにラベルを付け、寒天培地に添加する試薬を調製する。

プレートのラベル:マーカーペンで LB、LB/amp、LB/amp/ara 培地が判別できるように記載する。

試薬調製:

アンピシリン:凍結乾燥品ボトルに直接形質転換溶液 1 mL 添加→30 mg/mL

アラビノース:凍結乾燥品ボトルに直接形質転換溶液 3 mL 添加→200 mg/mL

オートクレーブより取り出した寒天培地を、まず攪拌する。寒天が底に沈んでいる可能性があるためである。フラスコを手で軽く触れる温度(60°Cくらい)になった時点^(注)で、プレートへの分注を開始する。アンピシリン、アラビノースを加える培地では、まずアンピシリンを加えよく攪拌後、16枚のプレートに分注。更にアラビノースを添加した後、8枚のプレートに分注(図19)。分注したプレートは、寒天が固まるまで室温で放置する。

注:アンピシリン・アラビノースは、熱に弱いため三角フラスコを手で軽く触れる温度で添加する。

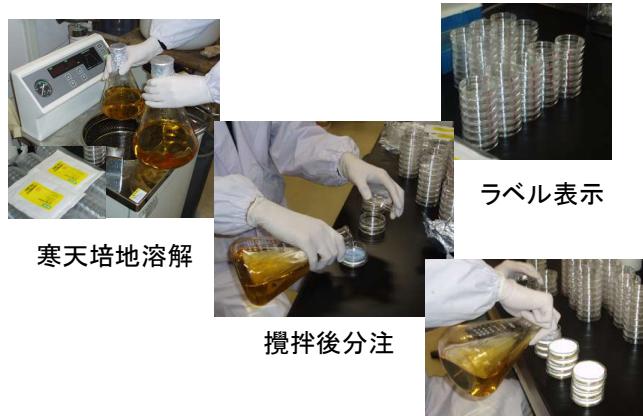


図19 寒天培地の分注

6-2-4. 寒天培地の水分除去

寒天上に水分が多く残っていると、コロニーが流れてしまう場合がある。このため、固化した後、クリーンベンチ中でふたを開けて数時間放置するか、ふたをしたまま24時間以上室温に放置することで、水分を蒸発させたほうがよい。

6-2-5 試薬調製

まず、分注するチューブに試薬名ラベル表示をマーカーペンで記載する。

(形質転換用溶液:Bu、プラスミドDNA:pGLO、LB培地:LB)

分注は、マイクロピペットもしくは、キットの使い捨てピペット(スポット)を用いて行う(図20)。

pGLO プラスミドDNA:凍結乾燥品ボトルに直接形質転換溶液 250 μ L 添加 \rightarrow 80 μ g/mL

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。

試薬分注

□pGLO プラスミドDNA溶液:60 μ L/1チューブ \rightarrow 2グループ/1チューブ 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"でも良い。) 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

□LB (Lysogeny Broth, Luria-Bertani) 液体培地 0.8 mL/1チューブ

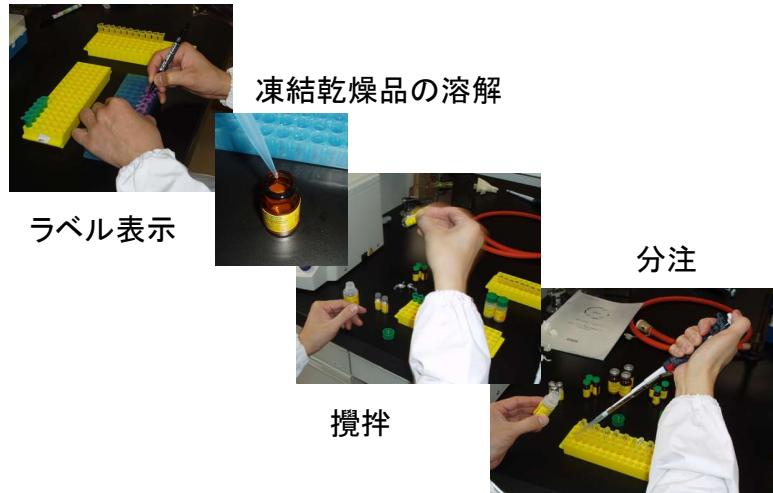


図20 ラベル表示と分注

撮影協力:原田和雄先生(東京学芸大学)

6-2-6. スタータープレートの作製

LB培地プレート(アンピシリン、アラビノースが添加されていない培地)を準備し、”Bu”(CaCl₂) 250 μL に溶解した大腸菌をループにより植菌する。ループの辺縁に大腸菌を少量付着させ、ループで寒天培地表面をなぞるようにしてプレート全面に植菌する(図21)。1回採取した菌をプレート全面に伸ばすように植菌する。

植菌後、37°Cのインキュベータで培養する。**培養時間は、16~20 時間が良い。**培養後小さなコロニーが多く見られる。これらのコロニーには、対数増殖期に相当する増殖状態が良好な大腸菌が多数見られる。実験の成否は、増殖状態が良好な菌を用いることで重要である。

(形質転換に用いる菌の選び方は、p. 42 参照)

注:コロニー数が少ない場合に有効な「2段階(2ステップ)培養」によるスタータープレート作製方法は、p. 70-72に掲載されています。

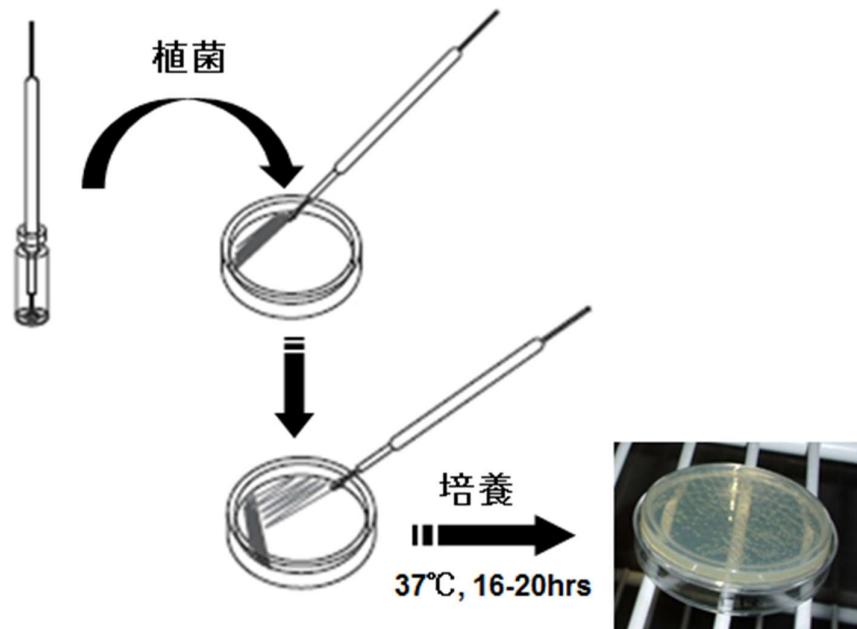


図21 スタータープレートの作製

6-2-7. 資料の作成

Bio-Rad laboratories のマニュアルは米国高等学校の advanced placement (AP) プログラムに対応している。また、レッスンごとのテストは、米国の授業を想定しており、必ずしも日本の教科書に対応していない。このため、レッスンごとのテストをそのまま使用するかどうかは、実施する教員が検討する必要がある。

Biotechnology Explorer™ 実習用テキスト Kit 1

pGLO バクテリア遺伝子組換えキット(166-0003JEDU) 日本語説明書

https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lse/japan/japanese/literature/M4119_Kit_1.pdf

6-3. 実験台の準備

実験を行う当日、実験グループごとに以下の器具、試薬等を配置する。

スタータープレート1枚、プレート(LB1枚, LB/amp2枚, LB/amp/ara1枚)、氷、試薬、ピペット、ループ、はさみ、マーカーペン、ラック、チューブ等。

オートクレーブと37°Cインキュベータは、共同で使用する。

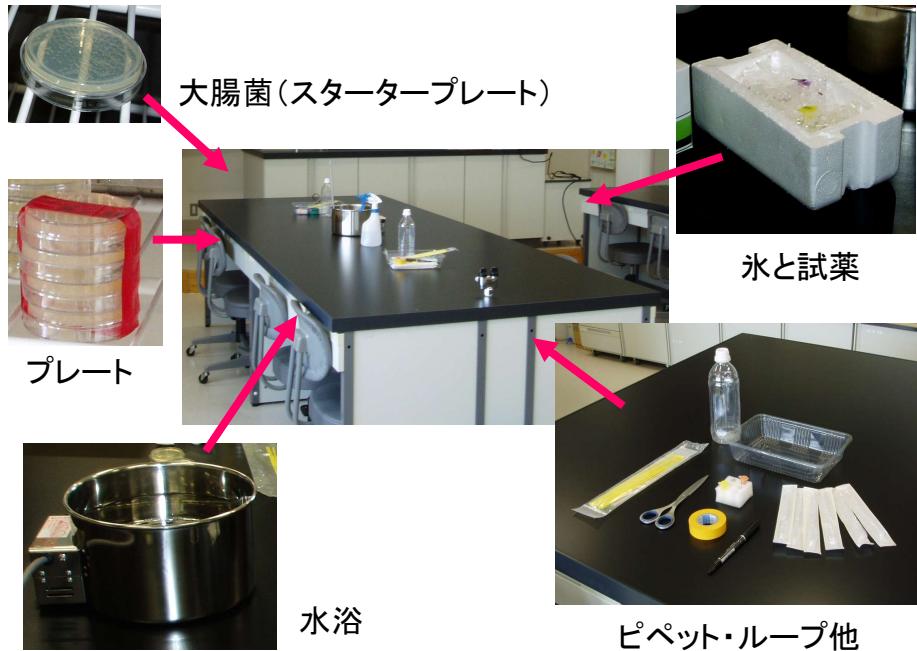


図22 実験台の準備

7. 教育目的遺伝子組換え実験(形質転換)

実験開始前にいくつかの事項を確認する。

7-1. 実験開始の確認事項(図23)

実験室内では靴の履き替え、白衣の着用が望ましい。

実験前に、窓とドアを閉めて閉鎖系にする(物理的封じ込めP1とする)。

腕まくりし手を洗う。(実験終了後も行う。)

実験台に70%エタノール溶液を噴霧し殺菌する。(実験終了後も行う。)

プラスミドDNAを扱う場合、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。

使用する器具・試薬等は滅菌済みのものを用いる。使用後の器具・試薬等は滅菌して廃棄する。

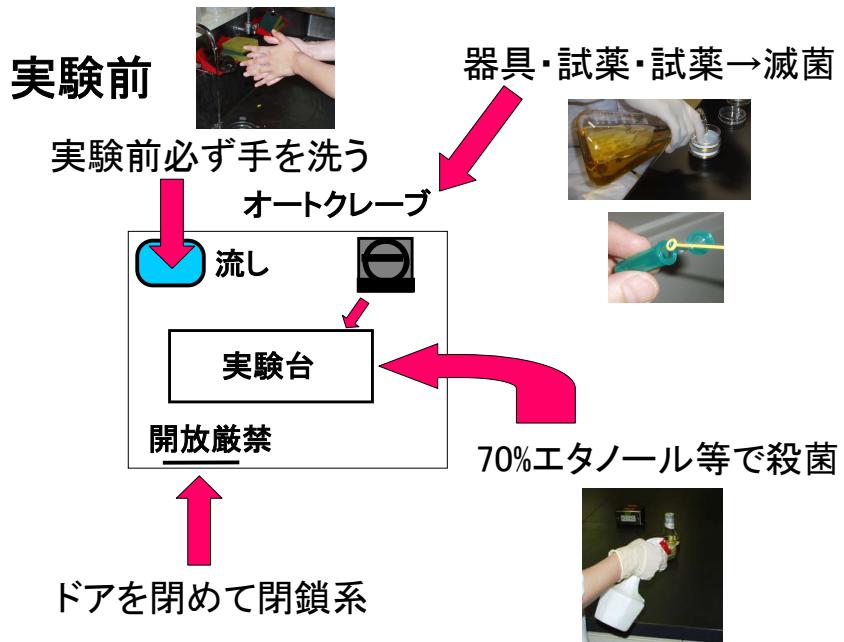


図23 実験開始前の確認

7-2. 実験方法:pGLO プラスミドによる大腸菌 (K12 株、HB101) の形質転換実験 (図 24、25)

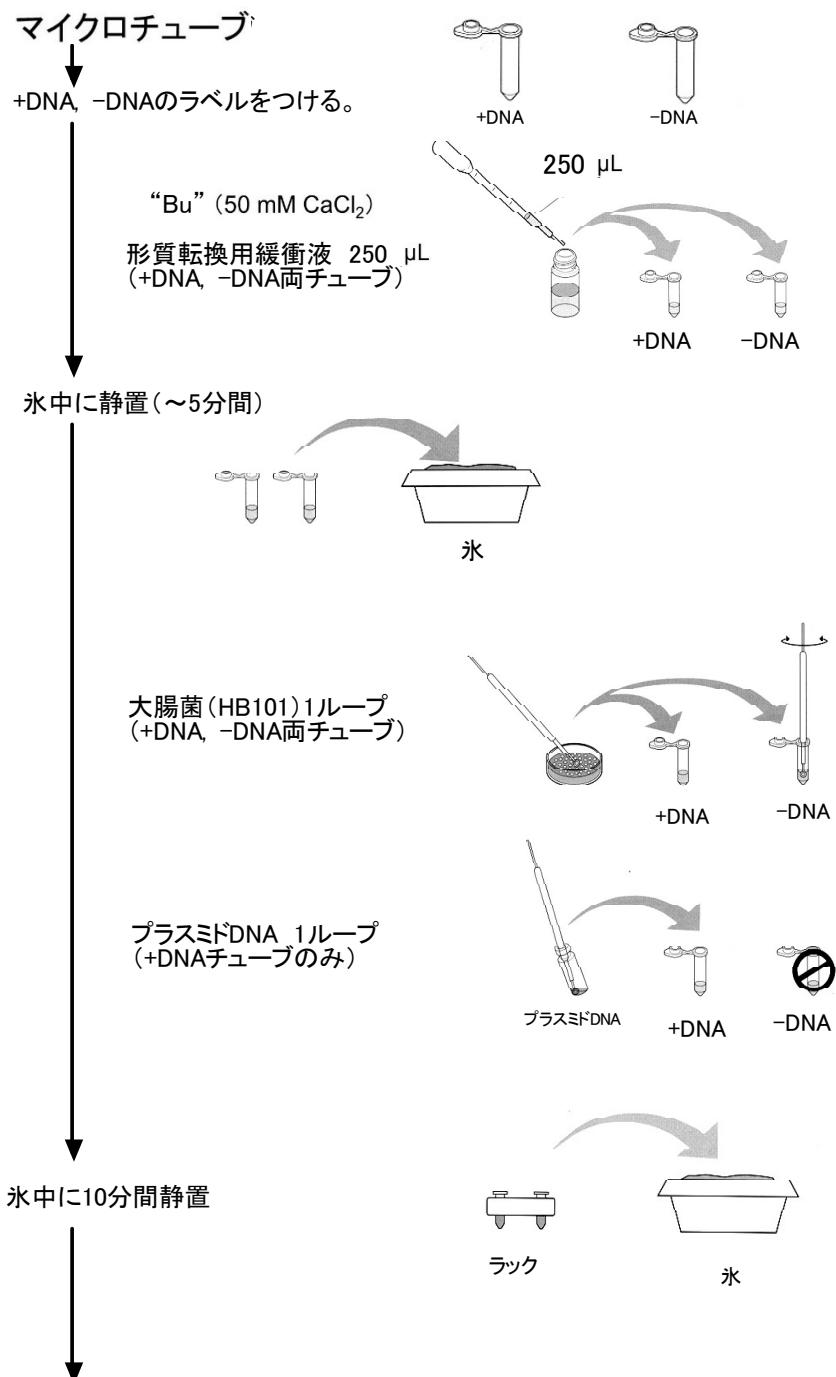


図 24 形質転換プロトコール

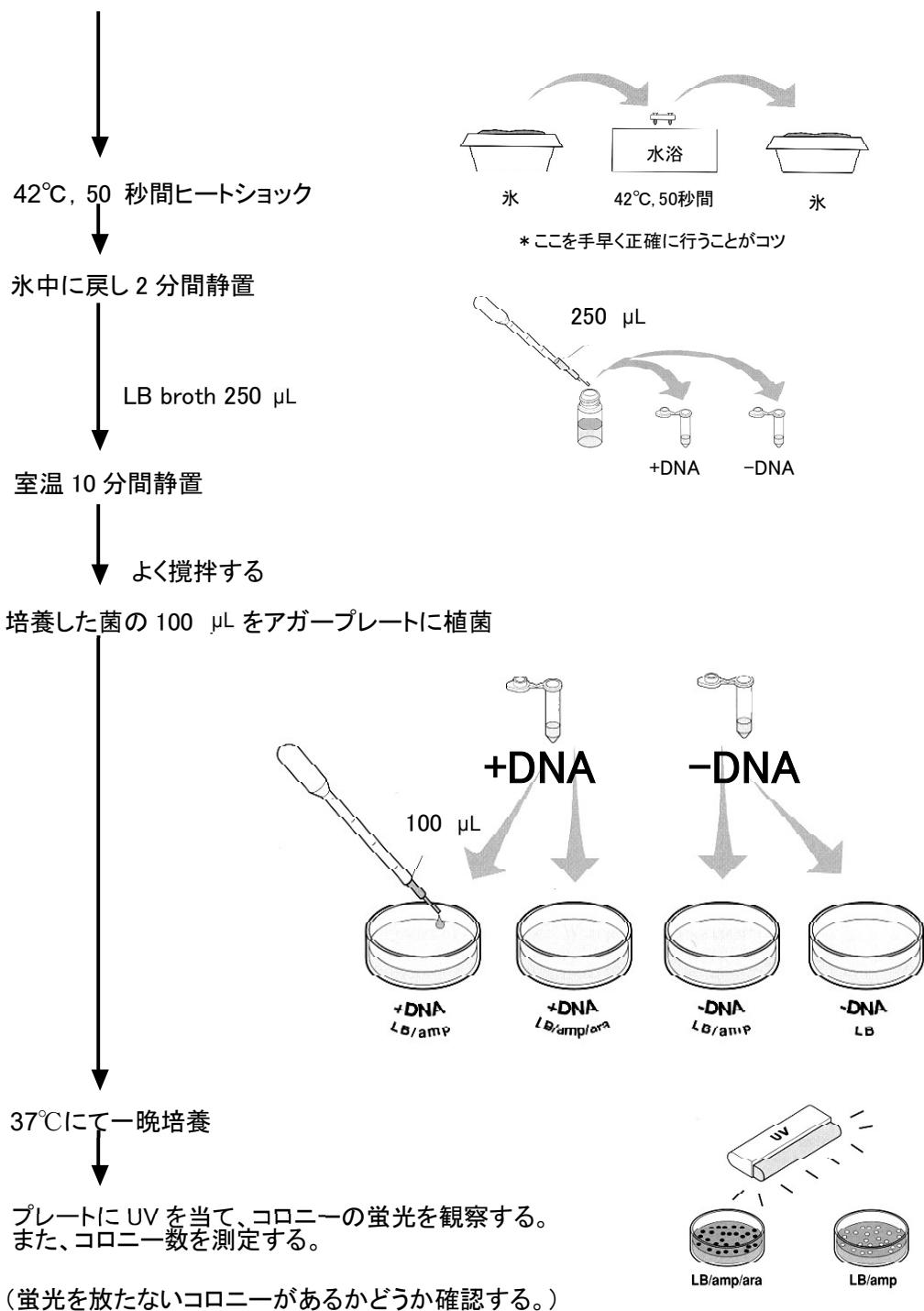
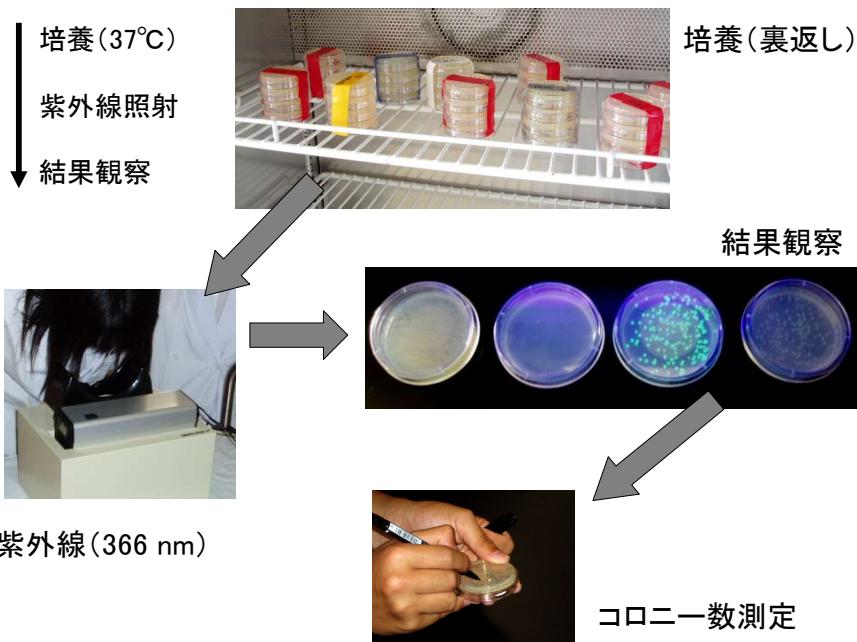




図25 形質転換操作(写真)



実験中

DNaseの混入を避ける
→ 静粛に実験する



廃棄物処理

オートクレーブ滅菌



実験後

必ず手を洗う



オートクレーブバッグ



撮影協力: 鳴原康浩先生、伊藤仁先生、阿部憲一先生、庄司良二先生
(福島県立福島明成高等学校、2003年)

7-3. 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、チューブ内で起こっている反応も示す。

① ピペットで液を採取

本実験で使用する場面:

○形質転換緩衝液(Bu)添加、○LB-broth 添加、○形質転換した菌の採取

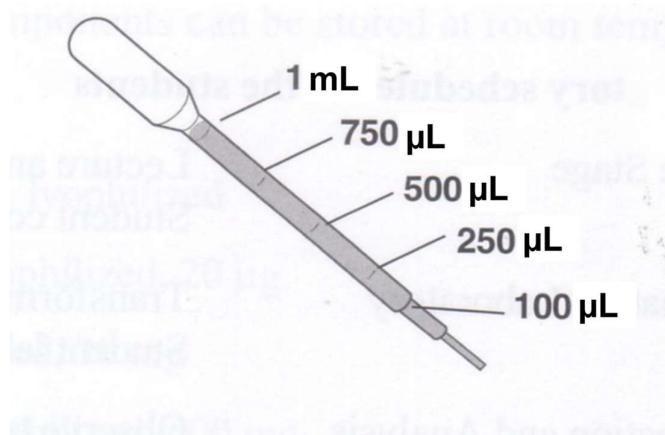


図 26 使い捨てピペット(スポット)

使い捨てピペットは、滅菌した状態で 1 本ずつ袋に入った状態で供給される。

直前に袋から出し使用する。100 μL～1 mL を採取できる(図 26)。

② 使用する菌の増殖状態と数

スター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、培養時間は、16～20 時間が適当である。

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。

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 27A))である。このため大きいコロニーを選び、増殖の盛んな辺縁部の菌を多く採取する必要がある(図 27B)。しかし、現実に大きいコロニーの辺縁部をループで採取することは現実には難しい。そこで、小さいコロニーが散在している場所を探し、小さいコロニーを 5 個くらい採取すると増殖状態のよい菌が得られる(図 27C)。

本実験では、全てのコロニーは同一のクローンと考えて問題ない。このため、コロニーが小さい場合は、單一コロニーにこだわらず複数のコロニーを採取する(図 27C)。十分な菌数を確保しチューブに加えることが大切である。

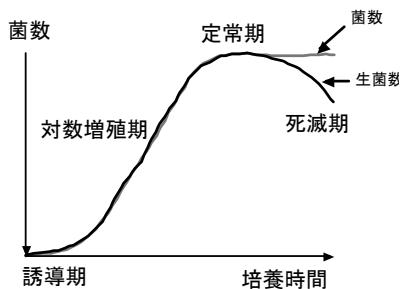


図 27A 菌の増殖曲線
対数増殖期の菌を使用する。

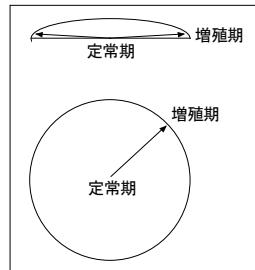


図 27B 一つのコロニーにおける菌の増殖
コロニーの辺縁部に良く増殖した菌が存在する。



図 27C スタータープレートの状態
○印のように小さなコロニーが散在している箇所からコロニーを採取する。

③ 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(CaCl_2)溶液であるため、コンピテント細胞に移行しつつある懸濁した菌は不安定な状態にある。特にプラスマ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、チューブが充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 28)。

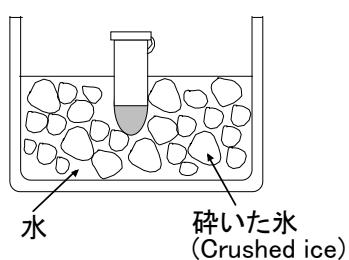


図 28A 砕いた氷を用いた場合

④ プラスミド DNA を確実に採取

“+DNA”のチューブにプラスミド DNA 溶液を添加する。ループを用い、プラスミド DNA 溶液を表面張力により「シャボン玉」のように採取する(図 29)。採取された溶液量は、約 10 μL (0.8 μg) である。(プラスミド DNA 溶液濃度:20 $\mu\text{g}/250 \mu\text{L}=0.8 \mu\text{g}/10 \mu\text{L})$

図 28B アルミホイルで氷を覆った場合

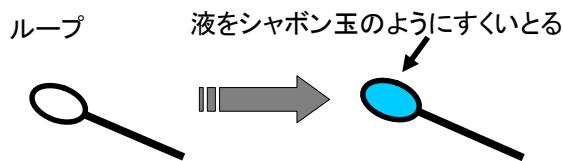


図 29 ループによるプラスミド DNA の採取

⑤ ヒートショック

ヒートショックは、氷中>42°C・50 秒>氷中、と連続的に温度差をつけなければならない(図 17)。このため、あらかじめ42°Cにセットした水浴の脇に、チューブをさした氷容器を移して操作する。この温度差により大腸菌の膜の流動性が変化することで、プラスミド DNA が菌の中に入り込む。42°C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(図 30)。

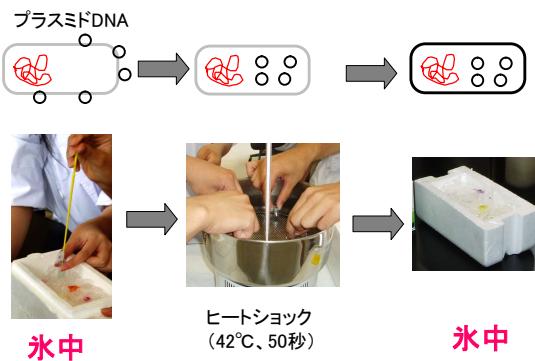


図 30 ヒートショック

⑥ LB broth 添加後の放置

放置中に β lactamase ならびに AraC の遺伝子が発現し各々のタンパク質が翻訳・產生する。この放置時間中に抗生物質を分解できる能力(抗生物質耐性)の獲得、ならびに AraC タンパク質のプロモーター配列(PBAD)への結合による GFP 遺伝子発現の抑制も起こる。

⑦ 液の混合

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、泡を立てたり、氷から出して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ので注意する。植菌の際は、LB 培地中の菌は沈んでいるため、よく混合する。

⑧ プレートの培養

プレートは裏返して培養する。培養中は、蓋が下、培地が上になるようにする。蓋が上になった場合、水蒸気が蓋の内面で水滴になり培養中に培地表面に落ちることがある。これは、コロニーが流れる原因となる。

⑨ プレートへの必要事項の記載

プレートに amp+、ara-など必要事項を記載する際、翌日の観察の妨げにならないように、プレートの周りや表面の端などに記載する。

7-4. 実験結果のまとめ

Bio-Rad 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)。

各プレートでのコロニーの有無観察後、紫外線を照射し蛍光の有無を調べる。更に、+DNA, LB/amp, LB/amp/ara のプレートについて、コロニー数を測定する。

① 各プレートの観察

あらかじめ、各プレートでコロニーが形成されるかどうか予想し、各プレートのコロニーを観察し状態をスケッチもしくは写真撮影する。

② 蛍光観察

紫外線を照射し蛍光を観察する。

紫外線は長波長側(366 nm)のものを用いる。

pGLO で発現する GFP の励起波長は 380 nm 付近をピークとしているため長波長側のトランスイルミネータを用いる。トランスイルミネータを用意できない場合、市販のブラックライトでも蛍光を観察

できる。短波長側(例えば 254 nm)のトランスイルミネータでは、かえって蛍光が弱くなる。また短波長は高エネルギーで目や肌に危険であるため用いないほうが良い。長波長であっても紫外線は注意しなければならない。このため、可能ならばゴーグルを着用する。

また照射中に直接紫外線を裸眼で見ないようにする。

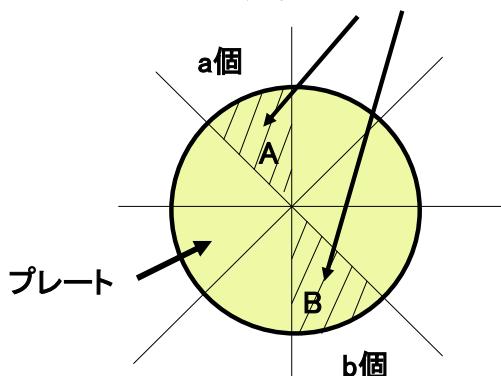
安全面を考えるとライトボックスを作るなどの工夫も良いであろう。

③ コロニー数の測定

プレート底からコロニーを観察し、マジックペンでドットしながらコロニー数を数える。

コロニー数が多い場合、プレートを 8 等分分子そのうち 2 箇所のコロニー数を測定後、全コロニー数を計算する。

プレートを8等分し、A,B 2箇所のコロニー数測定



$$\text{全コロニー数} = 4 \times (a + b) \text{個}$$

7-5. まとめのポイント

植菌した 4 枚のプレートを、比較することにより得られる知見をまとめてみる(図 31)

① 情報と機能、セントラルドグマ(+DNA, LB/amp/ara プレート)

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 タンパク質は、「蛍光を発する」機能を有する。

② 発現調節(+DNA, LB/amp プレート vs LB/amp/ara プレート)

プラスミド DNA を導入した大腸菌を、アラビノースを含む培地で培養すると、アラビノースがプロモーター配列(PBAD)に結合した 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に

より PBAD が露出する。このため RNA ポリメラーゼが PBAD に結合し GFP が発現する(本テキスト 13 ページ参照)。

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、蛍光を発する機能を持たない。pGLO プラスミドのプロモーター配列は大腸菌由来であるため大腸菌の RNA ポリメラーゼが結合できる(14 ページ)。

③対照実験の置き方(4 枚のプレート)

●実験系が成立しているか否か(生きた大腸菌が入っているかどうか)

→-DNA、LB プレート

●実験の再現性はどうか

→+DNA、LB/amp プレート vs LB/amp/ara プレート コロニー数比較

●抗生素質(アンピシリン)の効果はあるか

→LB/amp プレート、+DNA vs -DNA

●アラビノースによるタンパク質発現スイッチの ON/OFF は確認されたか

→+DNA、LB/amp プレート vs LB/amp/ara プレート

各々プレート同志を比較し確認する。

④実験の再現性とバラツキ

実験者全員のコロニー数のデータを比較し、再現性やバラツキの原因を考察する。

通常、形質転換実験では形質転換効率(比例計算によりプラスミド DNA 1 μ g で形成されるコロニー数:個/ μ g)を測定する。しかし、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。このような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、形質転換効率を求めなくとも、形成されたコロニーの数を観察することで充分比較できる。

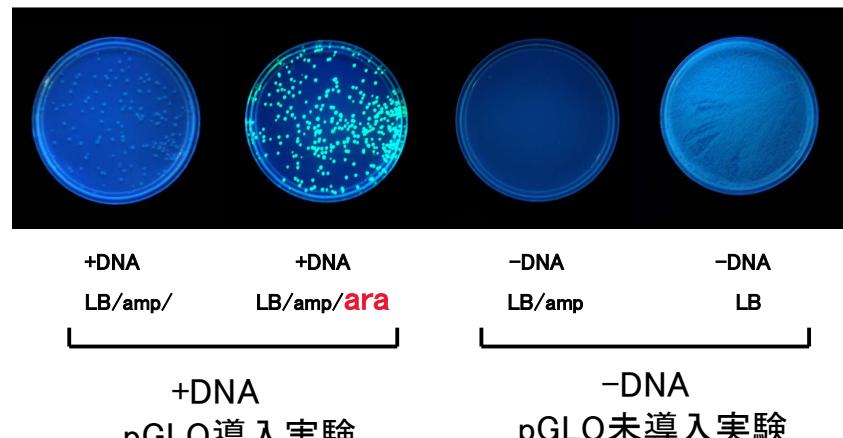
CaCl₂ にてコンピテント化された大腸菌の形質転換効率は、通常 10⁷~⁸ 個/1 μ g プラスミド DNA であるが、本実験では、10³ 個/1 μ g プラスミド DNA 程度である。

⑤ 菌の増殖

形質転換し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。

7-6. 実験結果例

形質転換



組換えDNA実験

図 31 形質転換結果例

amp:ampicillin ara:arabinose DNA:plasmid

E. coli:大腸菌 K12 株 HB101 LB:LB 培地

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トールピペットで 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 32)。

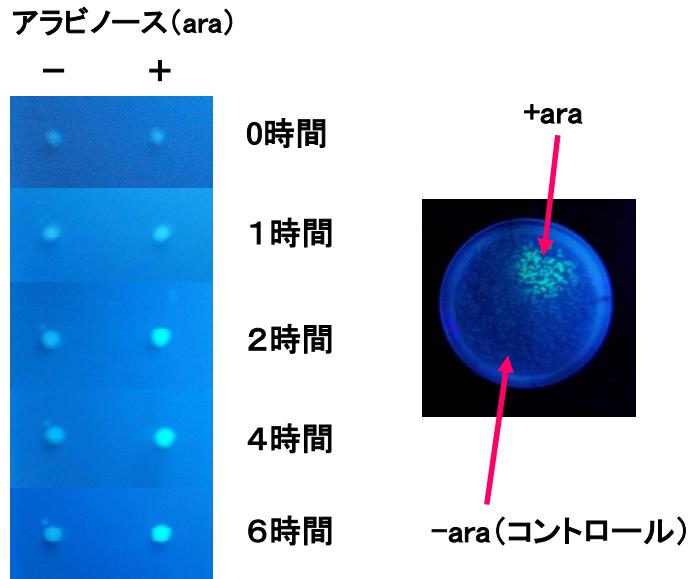


図 32 GFP 発現誘導実施例

7-7. 実験終了後の廃棄物処理

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(121°C、20 分)が原則である(図 33)。

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。

最低限、鍋で煮るなどの熱処理を行ってから処理する

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よい。

オートクレーブ



圧力釜



オートクレーブバッグ



図 33 オートクレーブ滅菌による廃棄物処理

実験で使用したピペット、ループ、プレート(スタータープレート、形質転換大腸菌プレート)は全てオートクレーブバッグに集め滅菌してから廃棄する(図 33)。

8. 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時、始めに実施する科目や実施時間の調整をしなければならない。続いて、授業で何を教えていかを明確にすることにより実施可能な授業概要(シラバス)や時間ごとの内容(コマシラバス)を作製する必要がある。同じキット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、授業の目的沿った計画作成が必要であろう。

① 分子生物学の基本であるセントラルドグマを学ぶ

遺伝子は、遺伝情報を伝える(遺伝)役割と活用する(遺伝子発現)役割をもっている。DNA には、遺伝情報が含まれ 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。) このことを体験的に学ぶ。

<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。しかし、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。

□培地にアラビノースを加えることで遺伝子発現が起り、ここで初めて 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形質転換大腸菌を培養し、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と、発現調節が更に明確になる。また、形質転換した大腸菌から 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実感できる。

□一般にどの細胞でもゲノムの遺伝情報を共通だが、各細胞での遺伝子発現の違いにより細胞の性格が決まり、細胞の分化に繋がる。GFP の遺伝子組換え実験を通じて学んだ遺伝子発現調節の仕組みは、細胞の分化を学ぶ基礎となる。

<参考>

ゲノムは、遺伝子を親から子へ伝えるとともに、遺伝情報を維持し、遺伝子を適当な組織で必要な時に必要な量を発現させる役割を担っている。1 人の人を見た場合、組換えが起こる生殖細胞や免疫担当細胞を除き、脳でも肝臓でも各組織に存在しているゲノム上の遺伝子のセットは同じである。しかし、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。また、発生の初期から各細胞では発現する遺伝子の違いにより細胞の分化がおこる。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。本実験でもちいた 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。このため遺伝情報によりタンパク質が作られるセントラルドグマばかりでなく遺伝子発現の教育に活用できる。

② 遺伝子組換え実験への興味関心の動機付けとする。

＜実験中の指導ポイント＞

□UVを当てても光らないGFPの遺伝子(プラスミド:pGLO)を大腸菌に導入すると、大腸菌はGFPを產生し、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学ぶ。

□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、遺伝子組換え実験(形質転換)を自分の手で体験する。

□実験の中で、実験から廃棄物の処理まで体験することで、組換え体の取り扱いを認識する。

□細胞内への遺伝子の導入は、組換え作物[genetically modified (GM) crop]の開発、遺伝子治療の研究、iPS細胞の作製など多くの遺伝子工学応用分野の基盤技術である。身近な新聞や書籍に書かれている先端バイオ技術と本実験との関連を考察する。

③ 遺伝子組換え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、研究レベルの遺伝子組換え実験に即して行う。

□滅菌・廃棄物処理含め自分で準備し、実験し、廃棄する全体の自ら体験する。

□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。

□対照実験(コントロール実験)の設定方法など、実験を通じて物を見る基本に重点を置く。

④ 更に発展した実習授業

□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しない大腸菌からDNAを抽出し、電気泳動にて形質転換した大腸菌でのプラスミドDNA(pGLO)の存在を示す。

□大腸菌が光ることは、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かめるため、Bio-Rad Explorer Kit 2を用いてGFPタンパク質を精製する。

□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①、②、③、④の要素に指導者が独自に考えた要素を付け加えて実験授業を組み立てる。

「実験ありき」での授業ではなく「生徒が何を学ぶ授業か」を明確にし、生徒の理解を促す手段として実験を位置付けることが重要であろう。

9. 参考図書

9-1. 実験に役立つ本

中村聰、中島春紫、伊藤政博、道久則之、八波利恵著:「新版 ビギナーのための微生物実験ラボガイド」講談社 2019

培地調製、無菌操作から遺伝子工学まで、微生物実験の基本が、わかりやすく解説されている。

堀越弘毅編、井上明、中島春紫共著:「図解 微生物学入門」オーム社 2009

微生物学の基本から、遺伝子工学の実験技術、バイオテクノロジーまで、豊富な図や写真を用いて丁寧に書かれた入門書。

大藤道衛:「バイオ実験超基本 Q&A 改訂版」羊土社 2010

なぜ白衣は着るの？ DNA を扱う基本は何？ 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

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 (電子図書)

実験操作のコツや実験結果の解釈、更には新たな実験法の開発や既存の実験法の改良には、原理や成り立ちを知ることが早道です。本書は、生命科学研究に登場する各種実験法を、分子生物学的、化学的、物理的原理ごとに分類・整理し、横断的に原理をまとめた実験入門書である。

Green MR and Sambrook J “Molecular cloning A laboratory manual” 4th ed. by Cold Spring Harbor Laboratory press 2012 (英語版の実験プロトコール)

Maniatis et al 第1版は、1980 年代はじめ遺伝子工学実験プロトコールのバイブルとして、多くの分子生物学研究者が活用した。第 4 版では、次世代配列解析技術、RNA 干渉、DNA メチル化技術やクロマチン免疫沈降によるエピジェネティック分析、バイオインフォマティクスが追加されている。最近、多くの実験書が市販されているが、平易な英語で書かれているこの本はやはり遺伝子実験のバイブルである。URL: <http://www.molecularcloning.com>

9-2. 米国高等学校生物学教科書

1. 池内昌彦・伊藤元己・箸本春樹・道上達男 監訳、中島春紫他訳「キャンベル生物学 原書 11 版」丸善出版 2018 “Urry・Cain・Wasserman・Minorsky・Reece: “Campbell Biology 11th ed.” (2017) の日本語版
2. 池内昌彦・伊藤元己・箸本春樹 監訳、中島春紫他訳「エッセンシャル・キャンベル生物学 原書 6 版」丸善出版 2016 “Simon・Dickey・Reece・Hogan: “Campbell Essential Biology 6th ed.” (2016) の日本語版
3. Micklos D. A., Freyer, G. A.: “DNA Science: A First Course” 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory press 2003
4. Leonard, W. H. and Penick, J. E.: “Biology A community context” South-Western Educational Publishing Cincinnati, OH 1998 (1990 年代の教科書、当時としては先端的内容)

9-3. 関連 URL

□NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

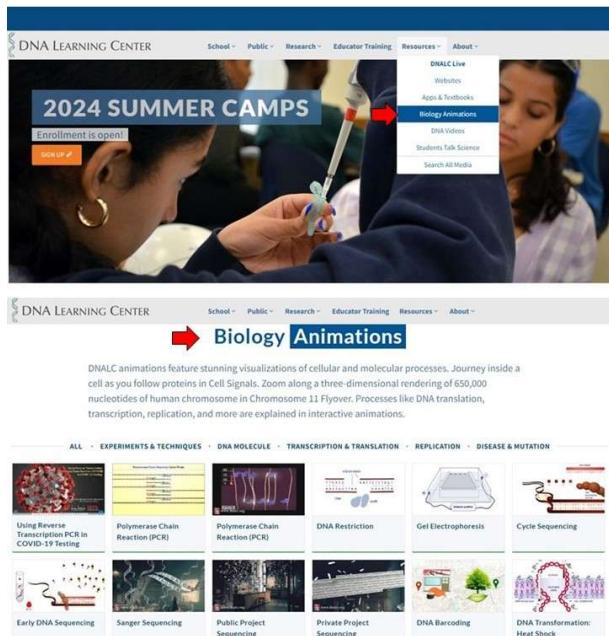
文献検索(PubMed)、遺伝子配列(GenBank)などバイオに関するデータベースのポータルサイト

□Bio-Rad Explorer <http://www.bio-rad.com/ja-jp/education> (日本語)

□Dolan DNA Learning Center <https://dnalc.cshl.edu/>

実験原理など教育に活用できる様々なアニメーションを入手できる。

Resources⇒Biology Animation へと進み目的にアニメーションをダウンロード。



10. 参考資料

10-1. 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: <https://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 Crameri, 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 Crameri, 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="MAEAQNDPLPGYSFNAHLVAGLPIEANGYLDFFIDRPLGMKG
YILNLТИRGQGVVKNQGREFVCRPGDILLFPPGEIHHYGRHPEAREWYHQWVYFRPRA
YWHEWLWPSIFANTGFFRPDEAHQPHFSDLFGQIINAGQGEGRYSELLAINLEQLL
LRRMEAINESLHPPMDNRVREACQYISDHLDNSFDIASVAQHVCLSPSRLSHLFRQQ
LGISVLSWREDQRISQAKLLSTTRMPIATVGRNVGFDDQLYFSRVFHKCTGASPSEF
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="MASKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT
LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTISFK
DDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNNSHNVYITADKQKN
GIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDNEKRDH
MVLLEFVTAAGITHGMDELYK"

```

gene 2636..3496
/gene="bla"
CDS 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="MSIQHFRLVALIPFFAAFCLPVFAHPETLVKVKAEDQLGARVGY
IELDLNSGKILESFRPEERFPMMSTFKVLLCGAVLSRVDAGQEQLGRRIHYSQNDLVE
YSPVTEKHTDGMTVRELC SAAITMSDNTAANLLTTIGGPKELTAFLHNMGDHVTRL
DRWEPELNEAIPNDERDTMPAAMATTLRKLLTGEELLTLASRQQLIDWMEADKVAGPL
LRSALPAGWFIADKSGAGERGSRGIIAALGPDGKPSRIVVIYTTGSQATMDERNRQIA
EIGASLIKHW"

BASE COUNT 1369 a 1368 c 1300 g 1334 t

ORIGIN

1 atcgatgcat aatgtgcctg tcaaattggac gaagcaggga ttctgcaaac cctatgctac
61 tccgtcaaggc cgtaattgt ctgattcggtt accaattatg acaacttgac ggctacatca
121 ttaactttt cttcacaacc ggcacggAAC tcgctcggtt tgccccgggt gcattttttt
181 aatacccgcg agaaatagag ttgatcgta aaaccaacat tgccggcgc ggtggcgtata
241 ggcatccggg tggtgctcaa aagcagcttc gcctggctga tacgttggtc ctcgcgccag
301 cttaagacgc taatccctaa ctgctgggg aaaagatgtg acagacgcga cggcgacaag
361 caaacatgct gtgcgacgct ggcgatatac aaattgctgt ctgccagggt atcgctgtat
421 tactgacaag cctcgctac ccgattatcc atcggtggat ggagcgactc gttaatcgct
481 tccatgcgcc gcagtaacaa ttgctcaaggc agatttatcg ccagcagctc cgaatagcgc
541 ccttccccctt gcccggcggtt aatgatttgc ccaaacaggt cgctgaaatg cggctggtg
601 gcttcatccg ggcgaaagaa ccccgtatttgc gcaaatttttgc acggccagtt aagccattca
661 tgccaggtagg cgcgcggacgc aaagtaaacc cactggtgat accattcgcg agcctccggaa
721 tgacgaccgt agtgatgaat ctctcctggc ggaaacagca aaatatcacc cggctggcaaa
781 acaaattctc gtccctgatt tttcaccacc ccctgaccgc gaatggtgag attgagaata
841 taaccttca ttcccgacgg tcggtcgata aaaaatcgaa gataaccgtt ggcctcaatc

901 ggcgtaaac ccgccaccag atggcatta aacgagtatc ccggcagcag gggatcattt
961 tgcgttcag ccatactttt catactcccg ccattcagag aagaaaccaa ttgtccat
1021 tgcacgac attgcgtca ctgcgtctt tactggctct tctcgctaac caaaccgta
1081 accccgctta taaaagcat tctgtacaa agcgggacca aagccatgac aaaaacgcgt
1141 aacaaaagtg tctataatca cgccagaaaa gtccacattt attatggca cggcgtcaca
1201 ctggctatg ccatagcatt tttatccata agattagcgg atcttacctg acgctttta
1261 tcgcaactct tactgtttc tccataccgg ttttttggg ctagaaataa ttttggtaa
1321 cttaagaag gagatataca tatggctagc aaaggagaag aactttcac tggagttgtc
1381 ccaattcttg ttgaattaga tggtgatgtt aatgggcaca aatttctgt cagtggagag
1441 ggtgaagggtg atgctacata cgaaagctt acccttaat ttatggcac tactggaaaa
1501 ctacctgttc catggccaac acttgcact actttctt atgggttca atgctttcc
1561 cgttatccgg atcatatgaa acggcatgac ttttcaaga gtgccatgcc cgaaggttat
1621 gtacaggaac gcaactatatc tttcaaagat gacgggaaact acaagacgcg tgctgaagtc
1681 aagtttgaag gtgataccct tggtaatcgt atcgagttaa aaggatttga tttaaagaa
1741 gatggaaaca ttctcgacaa caaactcgag tacaactata actcacacaa tgtatacatc
1801 acggcagaca aacaaaagaaa tggaaatcaaa gctaacttca aaattcgcca caacattgaa
1861 gatggatccg ttcaactagc agaccattat caacaaaata ctccaattgg cgatggccct
1921 gtcctttac cagacaacca ttacctgtcg acacaatctg cccttcgaa agatcccaac
1981 gaaaagcgtg accacatgtt cttcttgag tttgtaactg ctgctggat tacacatggc
2041 atggatgagc tctacaaata atgaattcga gctcggtacc cggggatcct ctagagtcga
2101 cctgcaggca tgcaagctt gctgtttgg cggatgagag aagatttca gcctgataca
2161 gattaaatca gaacgcagaa gcggctgtat aaaacagaat ttgcctggcg gcagtagcgc
2221 ggtggtccca cctgacccca tgccgaactc agaagtggaa cggcgtagcg ccgtatggtag
2281 tgggggtcc cccatgcgag agtagggaaac tgccaggcat caaataaaac gaaaggctca
2341 gtgcaagac tggcccttc gtttatctg ttgtttgtcg gtgaacgcgc tcctgagtag
2401 gacaaatccg cggggagcgg atttgaacgt tgcgaagcaa cggccggag ggtggcggc
2461 aggacgccccg ccataaaactg ccaggcatca aattaagcag aaggccatcc tgacggatgg
2521 ctttttgcg ttttacaaa ctctttttt attttctaa atacattcaa atatgtatcc
2581 gctcatgaga caataaccct gataaatgtc tcaataatat tgaaaaagga agagtatgag
2641 tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc ctttttgcg gcattttgcc ttccctgttt
2701 tgctcacca gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagtgg gtgcacgagt
2761 gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagtttc gccccgaaga
2821 acgtttcca atgatgagca ctttaaagt tctgtatgt ggcgcggat tatcccgtgt
2881 tgaacgcggg caagagcaac tcggtcggc catacactat tctcagaatg acttgggtga

2941 gtactcacca gtcacagaaa agcatctac ggatggcatg acagtaagag aattatgcag
3001 tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaaactta cttctgacaa cgatcggagg
3061 accgaaggag ctaaccgctt tttgcacaa catggggat catgtaactc gccttgatcg
3121 ttgggaaccg gagctgaatg aagccataacc aaacgacgag cgtgacacca cgatgcctgc
3181 agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc tagcttcccg
3241 gcaacaatta atagactgga tggaggcggtaaaagttgca ggaccacttc tgcgctcg
3301 cctccggct ggctgggtaa ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg ggtctcg
3361 tatcattgca gcactgggc cagatgtaa gcccctccgt atcgtagtta tctacacgac
3421 ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag gtgcctcact
3481 gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga ttgatttacg
3541 cgcctgttag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtgggt tacgcgcagc gtgaccgcta
3601 cacttgcag cgccttagcg cccgctccct tcgccttctt ccctccctt ctgcacgt
3661 tcgcccgtt tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagt
3721 cttagggca cctcgacccc aaaaaactt atttgggtga tggttcacgt agtggccat
3781 cgcctgtata gacggttttt cgcctttaa cgttggagtc cacgttctt aatagtggac
3841 tcttggcca aactggaaaca acactcaacc ctatctggg ctattcttt gatttataag
3901 ggattttgcc gattcggcc tattggtaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg
3961 cgaattttaa caaaatatta acgtttacaa tttaaaagga tctaggtaa gatcctttt
4021 gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt gagtttctgt tccactgagc gtcagacccc
4081 gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgcgctaat ctgctgctg
4141 caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgggcgatcaaga gctaccaact
4201 ctgtttccga aggttaactgg ctgcagcaga ggcgcagatac caaaacttgt ccttctagtg
4261 tagccgtatgt taggcacca cttcaagaac tctgttagcac cgcctacata cctcgctctg
4321 ctaatctgt taccagtggc tgctgcacgt ggcgataagt cgtgtttac cgggttggac
4381 tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggcggctt gaaacgggggg ttctgtcaca
4441 cagcccgatc tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga
4501 gaaagcgcca cgcttcccgaa agggagaaag gcccgcacggat atccggtaag cggcagggtc
4561 ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggatctt ttatagtct
4621 gtccgggttcc gccacctctg acttgagcgt cgtttttgt gatgtcgatc aggggggggg
4681 agcctatgga aaaacgcacg caacgcggcc tttttacggc tccctggcctt ttctgtggc
4741 ttgttcaca tggatcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgg
4801 ttgtgttag ctgataccgc tcgcgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgac
4861 gaggaaagcgg aagagcgcct gatgcggat tttctccctt cgcacatgtc cggatattca
4921 caccgcataat ggtgcactct cagtaatac tgctctgatc cgcacatgtt aagccagat

4981 acactccgct atcgctacgt gactgggtca tggctgcgcc ccgacacccg ccaacacccg
5041 ctgacgcgcc ctgacggcgt tgtctgtcc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg
5101 tctccggag ctgcatgtgt cagaggttt caccgtcatc accgaaacgc gcgaggcagc
5161 aaggagatgg cgcccaacag tccccggcc acggggcctg ccaccatacc cacgcccggaaa
5221 caagcgctca tgagccgaa gtggcgagcc cgatttccc catcggtgat gtcggcgata
5281 taggcgccag caaccgcacc tgtggccgg gtgatgccgg ccacgatgctg tccggcgtag
5341 aggatctaat tctcatgttt gacagcttac c

配列中下線斜体部分は、プロモーター配列を、下線太字は遺伝子を示している。

オリジナル論文：

Crameri,A., Whitehorn,E.A., Tate,E. and Stemmer,W.P.

“Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling”
Nat. Biotechnol. 14 (3), 315–319 (1996)

論文要旨

“Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling.”

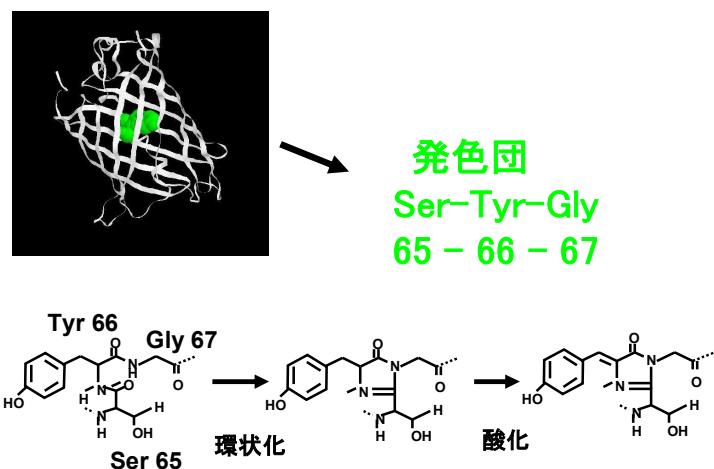
Crameri A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WP.

Affymax Research Institute, Palo Alto, CA 94304, USA.

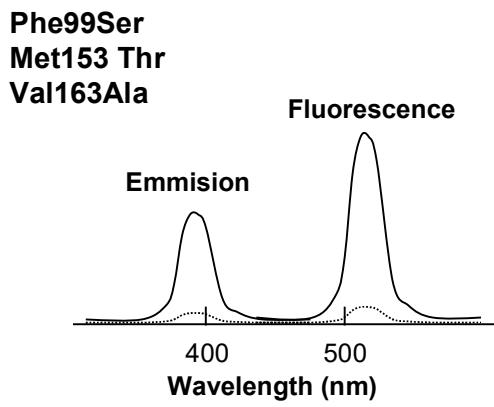
Green fluorescent protein (GFP) has rapidly become a widely used reporter of gene regulation. However, for many organisms, particularly eukaryotes, a stronger whole cell fluorescence signal is desirable. We constructed a synthetic GFP gene with improved codon usage and performed recursive cycles of DNA shuffling followed by screening for the brightest *E. coli* colonies. A visual screen using UV light, rather than FACS selection, was used to avoid red-shifting the excitation maximum. After 3 cycles of DNA shuffling, a mutant was obtained with a whole cell fluorescence signal that was 45-fold greater than a standard, the commercially available Clontech plasmid pGFP. The expression level in *E. coli* was unaltered at about 75% of total protein. The emission and excitation maxima were also unchanged. Whereas in *E. coli* most of the wildtype GFP ends up in inclusion bodies, unable to activate its chromophore, most of the mutant protein is soluble and active. Three amino acid mutations appear to guide the mutant protein into the native folding pathway rather than toward aggregation. Expressed in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, this shuffled GFP mutant showed a 42-fold improvement over wildtype GFP sequence, and is easily detected with UV light in a wide range of assays. The results demonstrate how molecular evolution can solve a complex practical problem without needing to first identify which process is limiting. DNA shuffling can be combined with screening of a moderate

number of mutants. We envision that the combination of DNA shuffling and high throughput screening will be a powerful tool for the optimization of many commercially important enzymes for which selections do not exist.

DNA シャッフルングにより得られた GFP から発現した GFP は、長波長側の紫外線で励起された場合、高い蛍光強度を有する。GFP の発色団は、65-67 番のアミノ酸により形成されている。一方、DNA シャッフルングにより選択された遺伝子から発現された蛍光強度が高い GFP は、99、153、163 番のアミノ酸置換が起こっている。



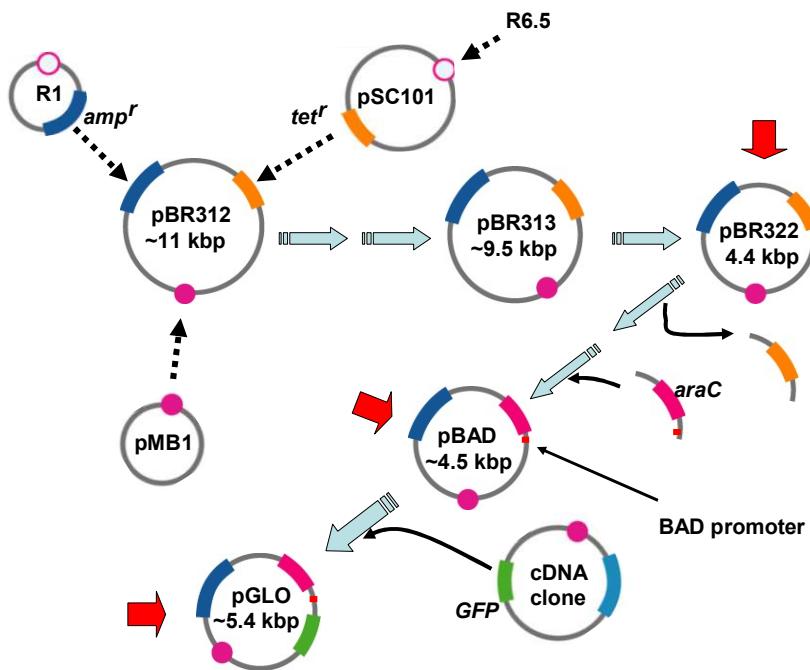
GFP は、65-67 番アミノ酸 (Ser, Tyr, Gly) により発色団を形成し、紫外線により蛍光を発する。



DNA シャッフルングにより発色団以外のアミノ酸変化がある。(Phe99Ser, Met153 Thr, Val163Ala) 図で直線が DNA シャッフルングにより得られた GFP 遺伝子より発現した GFP、長波長紫外線による励起効率が高く、蛍光強度も高い。

10-2. pGLO プラスミド DNA の起源

オワンクラゲがもつ GFP 遺伝子を含む pGLO プラスミド DNA は、古くから使われてきたプラスミドベクター pBR322 をベースに作られた。ここで、pBR322 プラスミド DNA 自身は大腸菌プラスミド DNA から組換えにより作られた。大腸菌のプラスミド DNA pMB1、R1、R6.5 から各々 *ori* *amp*^r *tet*^r が切り出され、pBR312 が調製された。この pBR312 から pBR313 を経てプラスミドの塩基対数を減らすことにより pBR322 が作られた⁽¹⁾。この pBR322 の *tet*^r という遺伝子を取り除き、*araC* 配列と pBAD プロモーターを挿入し、新たに構築された pBAD シリーズが完成する⁽²⁾。pBAD プラスミドに GFP 遺伝子をサブクローニングして構築されたプラスミド DNA が pGLO である。



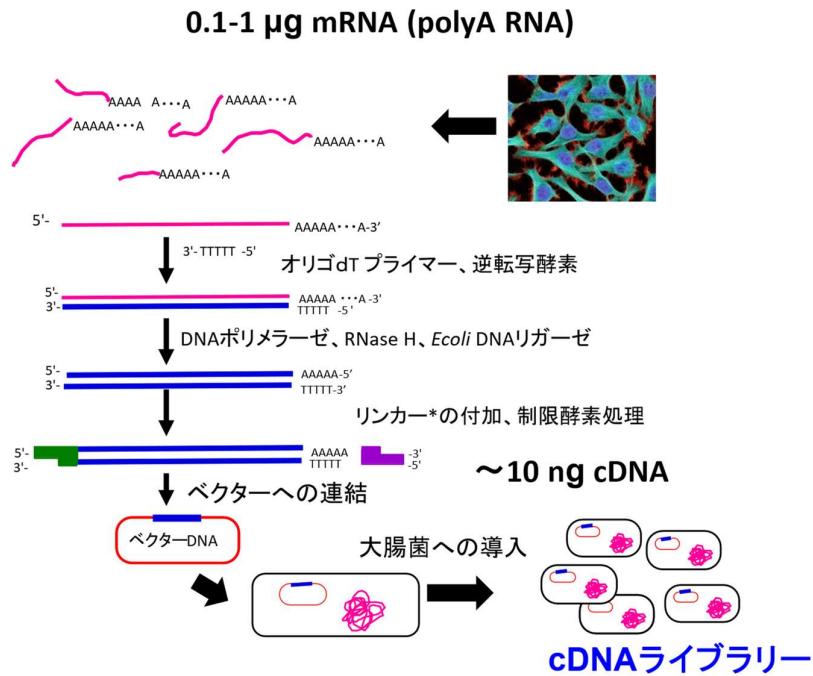
参考文献

- (1) pBR322: Bolivar F et. al.: "Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system." *Gene*, 2, 95–113. (1977)
- (2) pBAD: Guzman LM et. al.: "Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter." *J. Bacteriol.*, 177, 4121–4130. (1995)

10-3. 形質転換効率測定の必要性について

□ライブラリーと形質転換効率

cDNAを調製した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、少量のライブラリーDNA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。

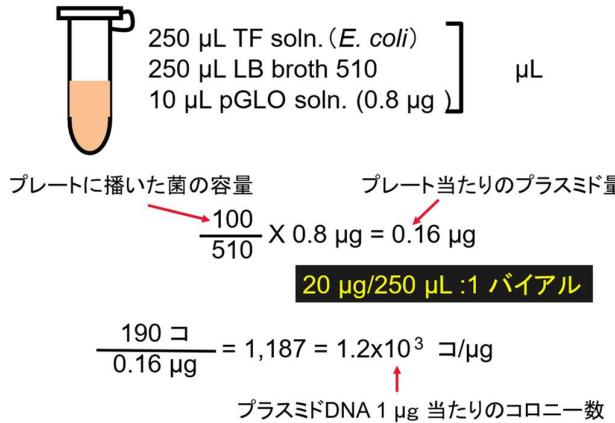


リンカー*:制限酵素サイトを持つ合成DNA

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、ナノグラム単位となる。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る。通常、宿主(大腸菌)とベクター(プラスミドDNA)との組み合わせ、なら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の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 µgで形成されるコロニー数 (colony forming unit: CFU) で比較する。ここではベクターとしてプラスミドDNAを用いた例で説明したが、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DNA 1ループ(約 10 µL、約 0.8 µg)を用いて、形質転換実験を行ったところプレート当たり 190 個のコロニーが形成されたとする。この場合、形質転換効率は、 1.2×10^3 コ

/μg プラスミド DNA である。



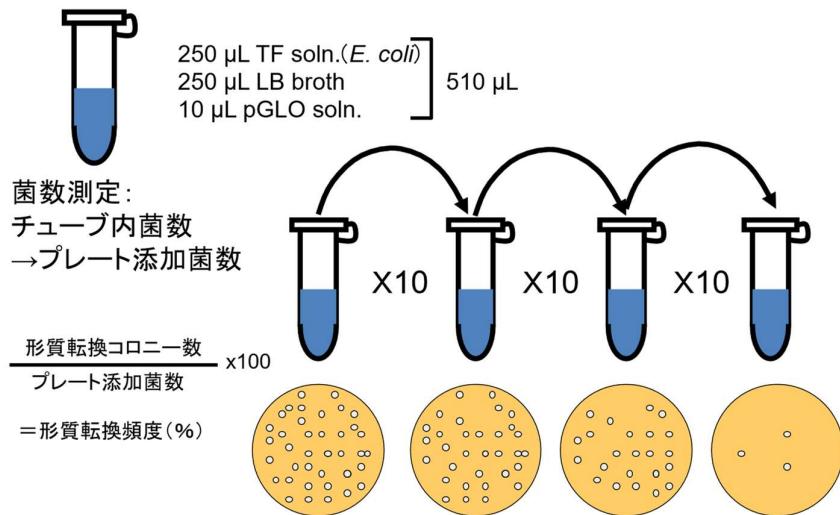
□形質転換効率の測定

プレート当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。ライプ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コロニーを作らせル必要がある。そこで通常、形質転換効率が、 $10^7 \sim 10^8$ 個/ μg 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もつて実験した場合、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、 $1/1,000$ から $1/100,000$ ですむ。図 16 の例の場合では、形質転換効率が 3.2×10^3 コ/ μg プラスミド DNA ならば $30,000$ コ/ $10 \mu\text{g}$ プラスミド DNA であるのに對し、形質転換効率が 3.2×10^8 コ/ μg プラスミド DNA ならば $30,000$ コ/ $0.1 \mu\text{g}$ 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。

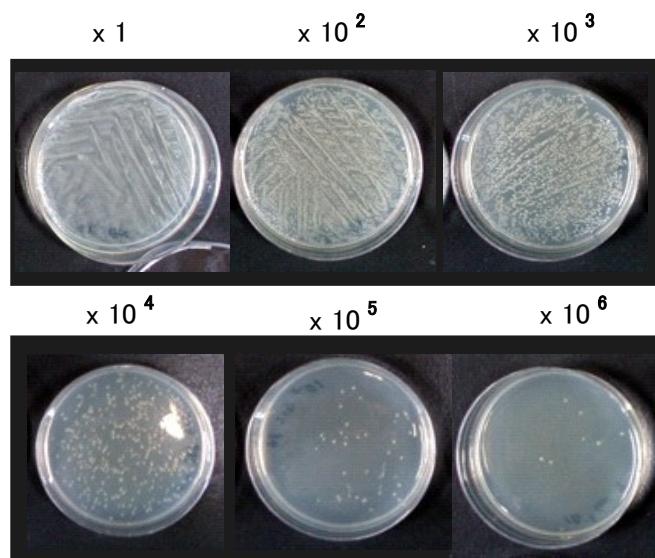
□形質転換頻度(菌数測定による形質転換頻度の推定)

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を推定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当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。



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し、培養することでコロニー数からチューブ内の菌数を計算する。チューブ内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比較することにより形質転換の頻度を測定する。形質転換頻度を測定するとプラスミドDNAが大腸菌に取り込まれる頻度は決して高いことがわかる。



例: 1. 形質転換プレートのコロニー数→520 個

2. 仕込んだチューブの希釀系列からのコロニー数→ $\times 10^4$: 389 個、 $\times 10^5$: 36 個

注: 1, 2ともに 1 枚のプレートに植菌した菌溶液は、100 μL である。

・プレートの全菌数を計算する。

目視にてコロニー数を測定できるプレートは、 $\times 10^4$ 、 $\times 10^5$ と考えられる。

(コロニー数が多いプレートはコロニー数が多すぎて測定できない。また、コロニー数が少ないプレートのコロニー数は 10 個以下であり、信頼性に欠ける。)

そこで、

389 個 $\rightarrow \times 10^4: 3.9 \times 10^6$ 個

36 個 $\rightarrow \times 10^5: 3.6 \times 10^6$ 個

のカウント結果から平均: 3.8×10^6 個(プレートの全菌数)

・形質転換した菌数は、520 個であることから、形質転換頻度を求める。

形質転換頻度(%) = $5.2 \times 10^2 / 3.8 \times 10^6 = 1.4 \times 10^{-4}$ (0.014%) となる。

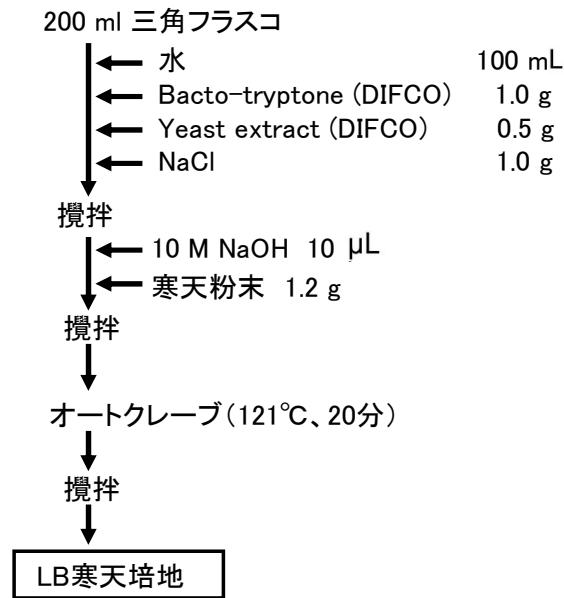
10-4. Lysogeny Broth (LB) 培地*調製方法

LB 培地は、自作できる。各成分から自作する方法と調製済み培地粉末を購入する方法がある。

*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 と呼ばれることがある。

①成分から調製する方法

Bacto-tryptone, Yeast extract (各 DIFCO 社製) NaCl(試薬特級)、NaOH(試薬特級)、寒天粉末を用意し、下記の要領で調製する。



注:NaOH は加えなくてもよい。液体培地を作成する場合は寒天粉末を添加しない。

②調製済み粉末から調製する方法

調製済み粉末例:日本製薬 LB 培地「ダイゴ」または LB 寒天培地「ダイゴ」(100mLx50 包)

LB 培地「ダイゴ」1包(2.5g)にイオン交換水もしくは蒸留水 100 mL を加え攪拌後、121°Cで 20 分間オートクレーブ滅菌する。

その他必要試薬:

アンピシリン:アンピシリンナトリウム(試薬特級) 30 mg/mL(滅菌水)

アラビノース:L(+) アラビノース(試薬特級) 200 mg/mL(滅菌水) (注:D(+)は不可)

プレート:プラスチックプレートを購入。プレート径は、どのような大きさでも問題ない。

10-5. オートクレーブ以外の滅菌方法

□乾熱滅菌(160°C、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 μ m のポア径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

エチレンオキサイ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の多くは、ガス滅菌済されている。

10-6. 組換えDNA実験における無菌操作とヌクレアーゼ

微生物を取り扱う基本は、特定微生物の純粋培養である。このため無菌操作とは、実験系へ他の微生物が混入させないこと、および実験にもちいている微生物を外部に漏らさないことを目的としている。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、実験系の外に漏れない操作をする必要がある。

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)などの核酸分解酵素(ヌクレアーゼ:Nuclease)の実験系への混入を防ぐことが目的である。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。

ヌクレアーゼは、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マスクや手袋を着用する。

DNA・RNAを取り扱う実験でも、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。しかし、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ー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必要である。

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(ろ過滅菌)。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、フィルターを通ってしまうため、DNA・RNAを扱う場合には有効ではない。

DNA・RNA抽出で用いる酵素は、高純度なもの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ーゼの混入を防いで使用する。

10-7. 実験に用いる水について

□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):水道水からイオン交換樹脂によりイオンが除去された水です。MgやCaイオンが多く含まれる硬水を用いる際は、蒸留してからイオ

ン交換樹脂を通したほうが、樹脂の劣化を防げる。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、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。培養では、オートクレーブ滅菌して用いる。比抵抗値:1~3MΩ・cm^(注)程度。

□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1~10MΩ・cm^(注)程度の水のことをいう。

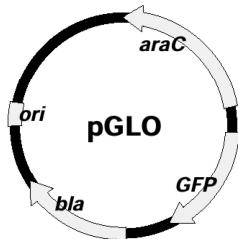
□超純水(DNA クローニング実験、動物細胞の培養):イオン交換樹脂処理、活性炭処理、Reverse osmosis(RO)膜処理等を組み合わせて処理された水。比抵抗値 17MΩ・cm^(注)以上。

注:比抵抗値の逆数である伝導率で示すこともある (MΩ・cm)⁻¹ = μS/cm

組換えDNA実験で使用する大腸菌など細菌の培養では、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で充分である。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やすい培養では純水または超純水を滅菌して使用する。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 程度で日本ジーンなど各メーカーから市販されている。

10-8. 二段階培養によるスタータープレートの作製

「Bio-Rad Laboratories 社資料(日本語)」



Biotechnology Explorer™

実習用テキスト

Kit 1

pGLO バクテリア遺伝子組換えキット

(1660003JEDU)

BIO-RAD

Biotechnology Explorer Kit 1 pGLO バクテリア遺伝子組換えキット マニュアル変更内容(M4119 1512H →2407I) 一覧

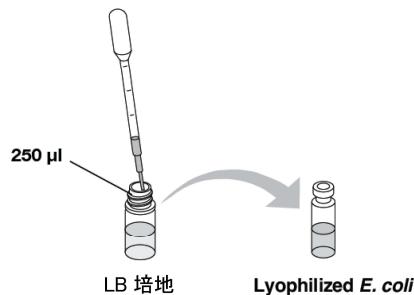
pGLO バクテリア遺伝子組換えキット	
ページ	変更内容
全体的に誤字・脱字等を訂正し、表現をより分かり易いよう改訂いたしました。	
テキストの上部にヘッダーを付けました。	
p.5, 67	文部科学省のホームページの URL を変更しました。
p.13	アンピシリンの溶解液量を英文マニュアルの変更に従い 3 ml と変更しました。
p.15	英文マニュアルの変更に従い 大腸菌の溶解液を、LB 培地にし、インキュベーション時間やプレートへの大腸菌のまき方などを変更しました。
p.17	スタータープレートの培養例の写真を掲載しました。
p.19	コロニーをすぐう数を 2~5 個としました。

教員用テキスト 事前準備ガイド

Step2; 実験の 24-36 時間前に行います。

1. 大腸菌溶液の調製

- 1-a. 大腸菌(*E.coli* HB101)のバイアルに 250 μ l の LB 培地を無菌のピペットで直接加えます。
開封した LB 培地は冷蔵で保存します。



- 1-b. 蓋をしてバイアルを優しく振らして混和します。
バイアルを 37°Cのインキュベーターに 8 時間程おきます(最大 24 時間まで)。

注意: 大腸菌の溶解液には LB 培地を使用してください。インキュベーションの時間は 8 時間より短くともスタータープレートのコロニーはできますが、時間によってスタータープレートのコロニーの数や大きさが変わります。(p.17 参照)。2.スタータープレートへの大腸菌溶液のまくを参照し、プレート上に大腸菌溶液の濃淡をつけてシングルコロニーが得られるようにしてください。

プレートを事前に冷蔵保存している場合は、少なくとも半日前に冷蔵庫から必要数取り出し、寒天培地を室温に戻しておきます。

2. スタータープレートに大腸菌溶液をまく

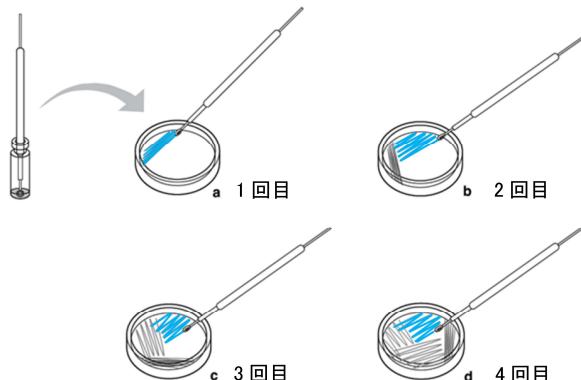
- 1.で調製した大腸菌溶液を8枚の“LB”プレートにまき、37°Cで 24 時間ほど培養します。適切な条件下で培養すると、おおよそ直径 1 mm のたくさんのコロニーが生えできます。

- 2-a. 37°Cに置いていた大腸菌溶液のバイアルを軽く懸濁し、植付け用ループを傾けずにまっすぐ入れて溶液を取ります。シャボン玉を作る時のようにループの輪に溶液の膜を張らせます。
ループの先を大腸菌溶液につけるのは 1 枚のプレートに対して 1 回のみで充分です。
8 枚のスタータープレートを作成するのに、ループは同じものを使用します。
注:バイアルのインキュベーション時間が長い場合は、ループの輪に膜を張ったものと張らないものなど、プレートごとに大腸菌溶液量に差をつけておくと、大腸菌が増えすぎてコロニーのできないプレートがでても、大腸菌の液量が少ないプレートで適正なコロニーができる、適切なスタータープレートを準備することができます。

- 2-b. 初めに、次の図のようにループを数回ほど往復させて塗布します。
次にプレートを 45° 回転させて 2 回目の塗布をします。ループを 1 回目に塗布された大腸菌溶液に接触させてから、塗布されていない培地のスペースに数回往復させて塗布します。

教員用テキスト 事前準備ガイド

45° 回転させて 3~4 回と残りの部分に広げていくことにより、シングルコロニーを得られる濃度に塗布されるように調整します。4 回目の塗布終了後、プレートの蓋をかぶせます。



2-c. 同様にして、計 8 枚の “LB” プレートに大腸菌溶液を塗布します。1 本のループでプレート 8 枚の塗布を行ってください。また、コンタミネーションを防ぐため、1 枚のプレートに塗布が終わったら、その都度、きちんと蓋を閉めてください。

2-d. 8 枚のプレートに塗布が終わったら、プレートを裏返しにして 37°C のインキュベーターに一晩おきます。24 時間前後に使用できるように授業計画を組みます。タイミングを逃しますと、その後の実験がうまくいかなくなることがありますのでご注意ください。
36 時間以上経過したスタータープレートは、形質転換を失敗する可能性が高くなりますので使用しないでください。また、スタータープレートを使用する前に冷蔵保存しないでください。

3. pGLO プラスミド溶液の調製

3-a. 新しい殺菌済みピベットを使用して 250 μ l の形質転換用溶液(精製水でも可)を pGLO バイアルに加えます。取り外したキャップに DNA が付着していないか確認します。

注意: DNA 量が少ないため、バイアルには何も入っていないように見えます。

溶解したプラスミド溶液は使用するまで冷蔵保存します。

実験の際、いくつかに分注して配布したい場合は、溶解する容量を 500 μ l まで増やす事は可能です。ただし、プラスミドの終濃度が薄くなる為、形質転換効率が多少下がることがあります。

