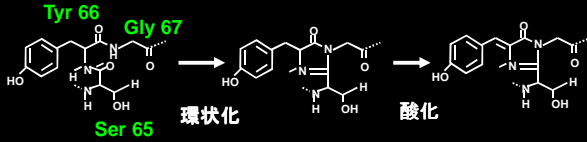


GFPの発色団



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"

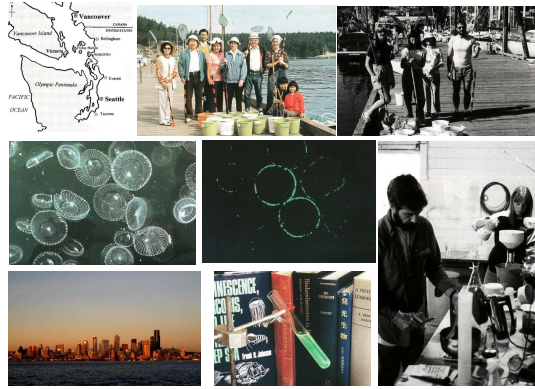
The Nobel Prize in Chemistry 2008

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

<p>Otsuru Shimomura ② 1/2 of the price USA Riviera Biological Laboratory (RBL), Woods Hole, MA, USA; Boston University Medical School, Massachusetts, MA, USA b. 1928 (in Kyoto, Japan)</p>	<p>Martin Chalfie ② 1/2 of the price USA Columbia University, New York, NY, USA; Harvard Medical School, Boston, MA, USA b. 1947</p>	<p>Roger Y. Tsien ② 1/2 of the price USA University of California, San Diego, CA, USA; Howard Hughes Medical Institute b. 1929</p>
--	---	---

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)



下村脩「イクオリンとGFPの発見」The Frontier Bioscience 22, 2-12 (1998) 4-5ページ

イクオリンからGFPへのエネルギー転移

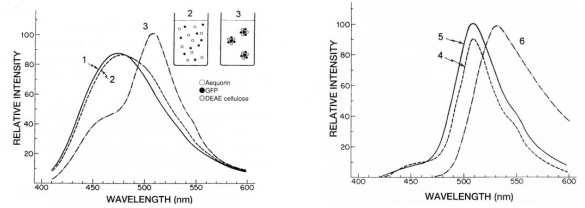
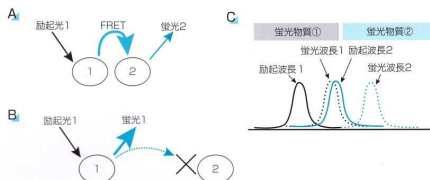


図5 イクオリンからGFPへのエネルギー転移を示す実験
イクオリンを種々の条件下で微量のカルシウムイオンで発光させてスペクトルを測定²⁴⁾。
(1) イクオリンの発光、(2) イクオリン+GFP、(3) イクオリン+GFP+DEAEセルローズ、(4) 3を遠心し沈澱をバッファに再懸濁、(5) オワンクラゲの発光スペクトル、(6) イクオリン+FMN+DEAEセルローズを遠心し沈澱をバッファに再懸濁。(2)と(3)では使用したイクオリン量もGFP量も全く同じである。

下村脩 「イクオリンとGFPの発見」The Frontier Bioscience 22, 2-12 (1998) 10ページ

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

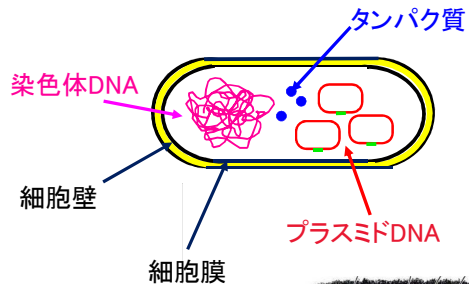
B) クエンチャーに FRET した場合
相手方の物質がクエンチャー (2) の場合、蛍光物質 (1) を励起させても FRET によりそのエネルギーは蛍光物質に転移し蛍光は発せられない。しかし、蛍光物質 (2) が離れている場合 (離れた状態) には、消光されず蛍光物質 (1) の蛍光が発せられる

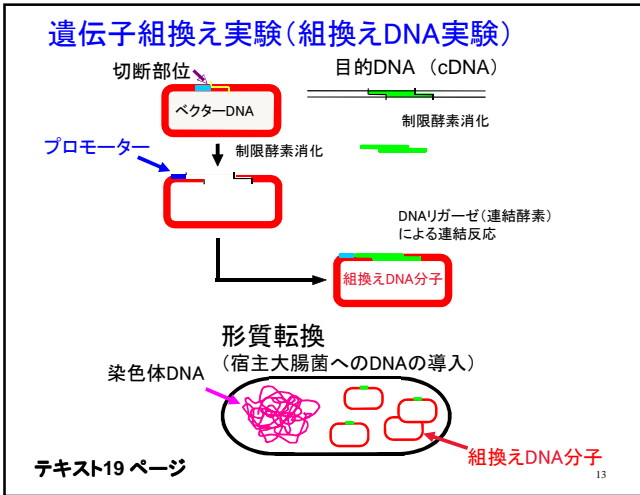
C) FRET と蛍光波長
FRET が起こる場合、蛍光物質 (1) の蛍光波長と蛍光物質 (2) の励起波長が重複している。このため励起状態の蛍光物質 (1) から、蛍光として利用されるエネルギーは蛍光物質 (2) の励起に利用される

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





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

Paul Berg
1972年 組換えDNA技術

James Watson, Sydney Brenner

1976年 Genentech 設立
Herbert W Boyer
Stanley Norman Cohen
Venture capitalist: Robert A Swanson

1980年 ノーベル化学賞
Walter Gilbert, Frederick Sangerとともに

<http://libraries.mit.edu/archives/exhibits/asilomar/index1.html#3>

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」

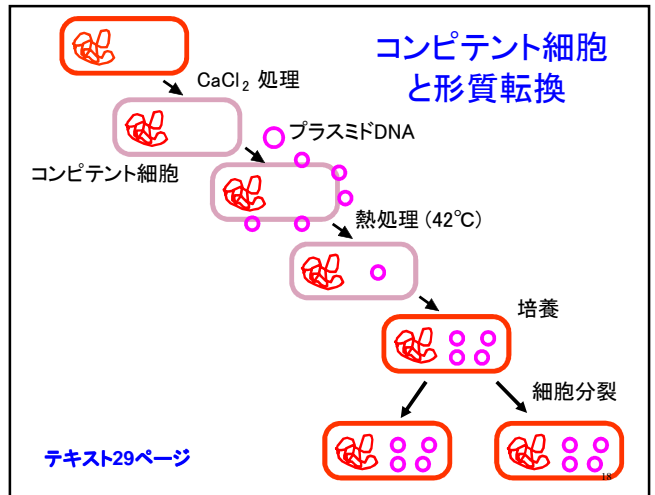
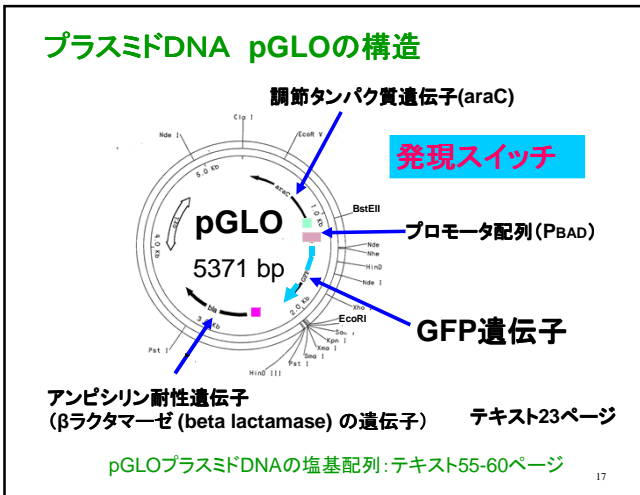
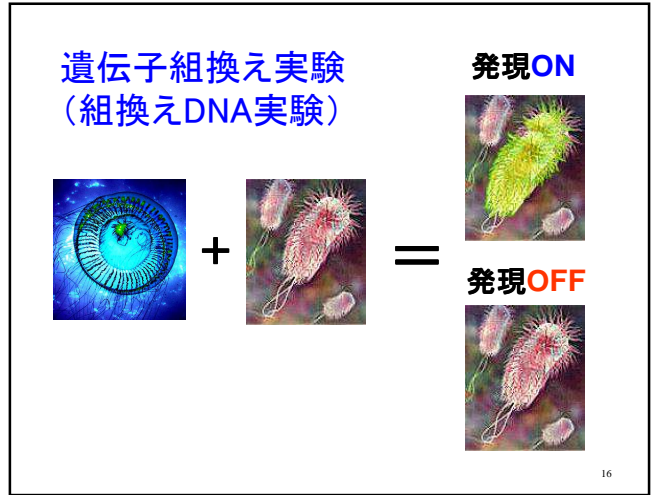
1999年バイオセーフティに関するカルタヘナ議定書

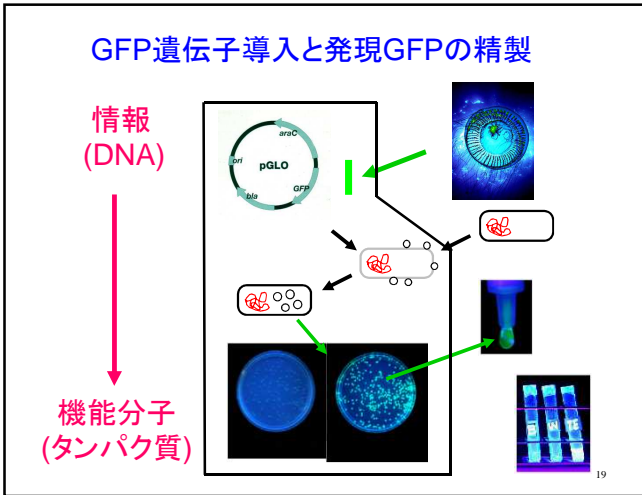
- ① 生物多様性の保全
- ② 生物資源の持続可能な利用
- ③ 生物遺伝資源の利用から生ずる利益の公正かつ公平な配分

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

15



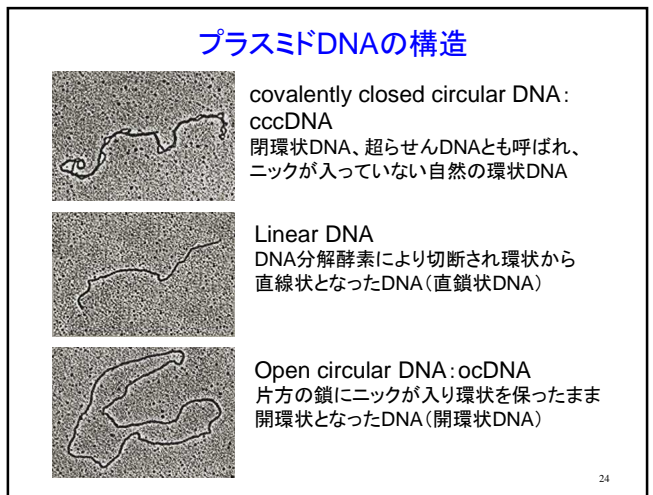
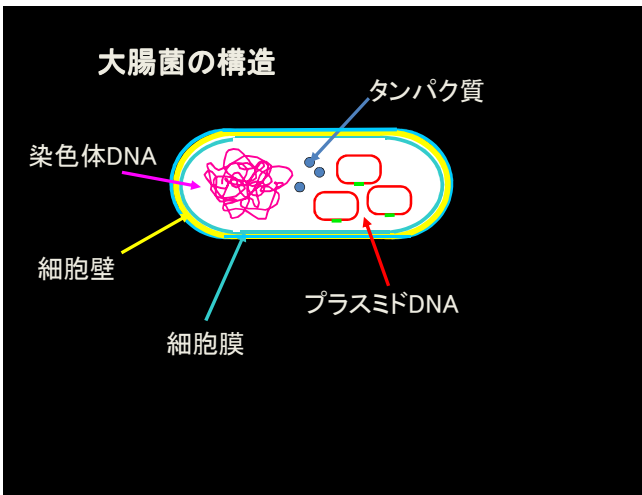
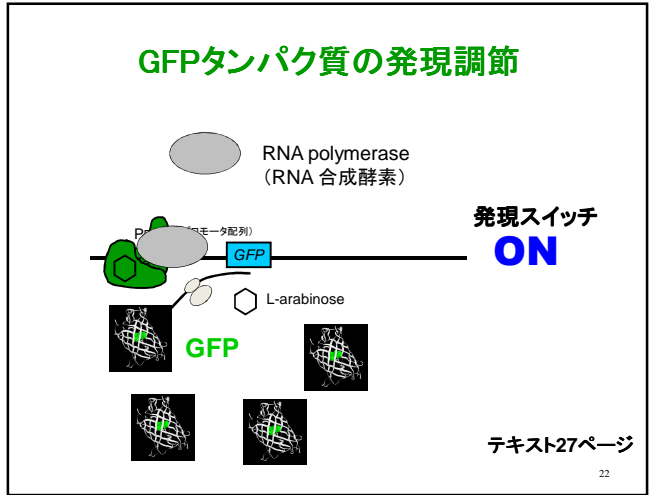
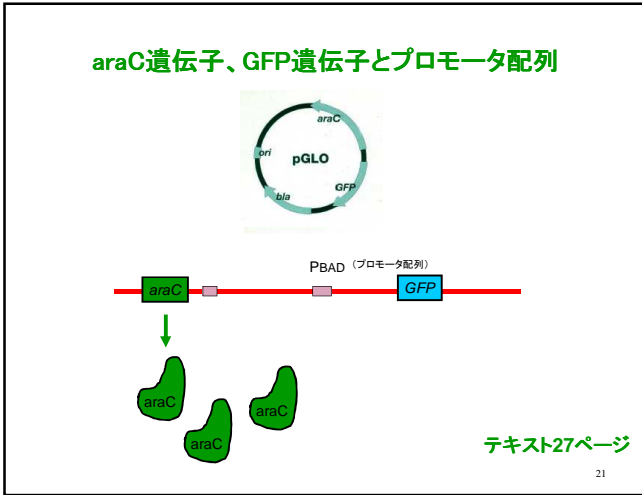


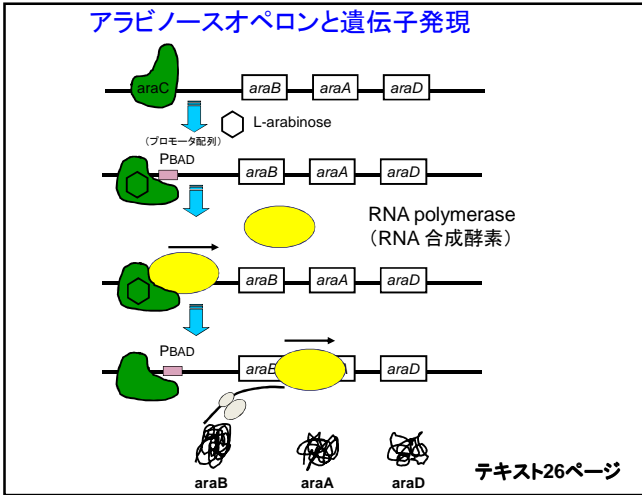
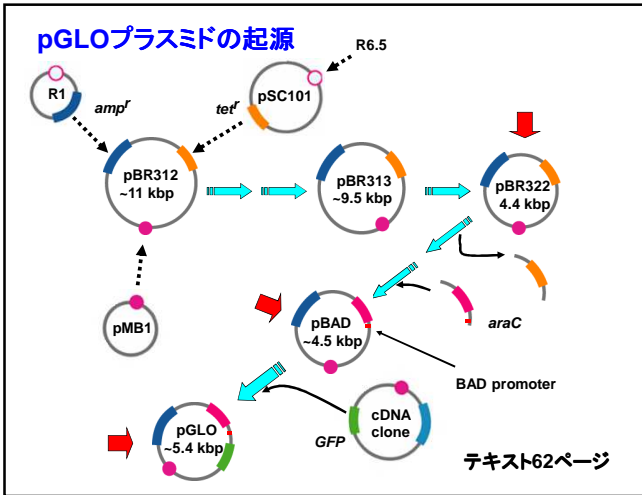
遺伝子の役割

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 遺伝子
Heredity Gene

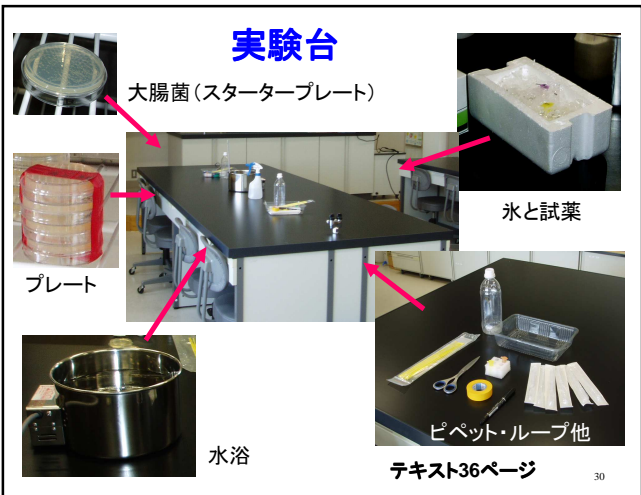
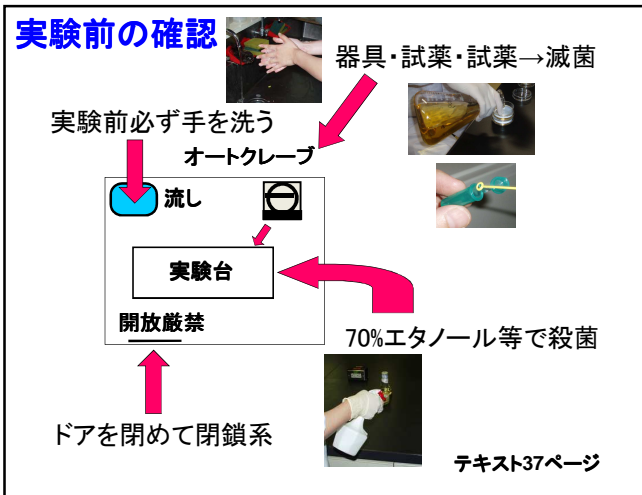
20





実験操作のポイント

28



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



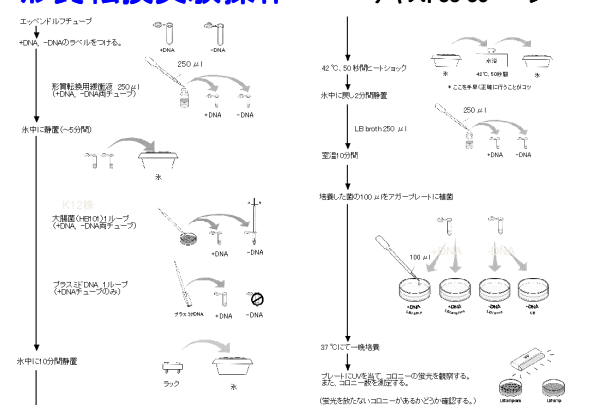
オートクレーブバッグ



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



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

大腸菌 (K12株: HB101) 添加

プラスミドDNA (pGLO) 添加

水中

ヒートショック (42°C、50秒)



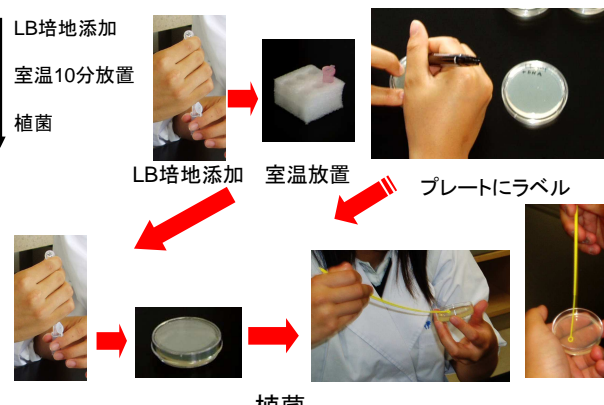
実験操作(1日目②) テキスト41ページ

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

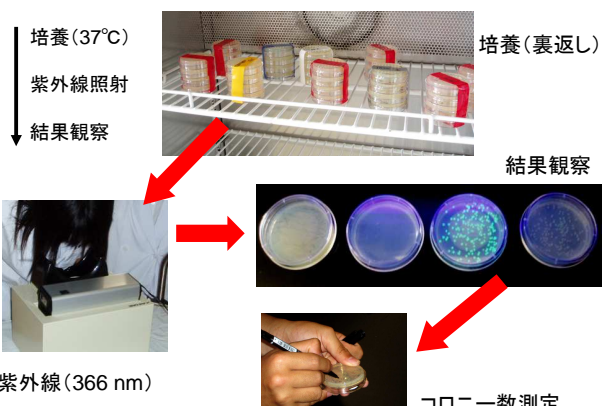
培養 (37°C)
紫外線照射
結果観察

培養 (裏返し)

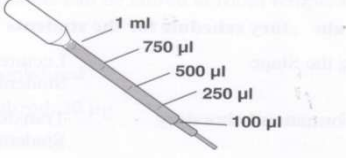
結果観察

紫外線 (366 nm)

コロニー数測定



① ピペットで液を採取

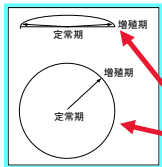
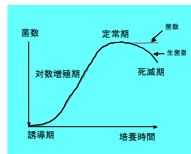


- 形質転換緩衝液添加
- LB-broth添加
- 形質転換した菌の採取

テキスト42ページ

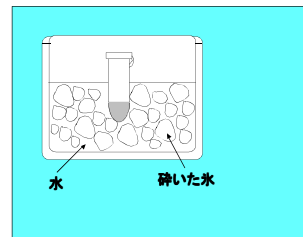
② スタータープレートから菌をしっかり採る

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
テキスト43ページ

③ 菌を形質転換緩衝液に添加した後、水中で確りと冷やす

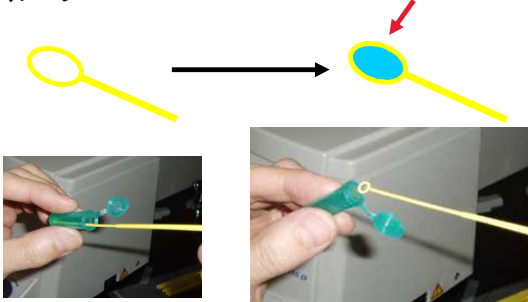


テキスト43ページ

38

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

水中 > 42°C・50秒 > 水中



テキスト44ページ

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

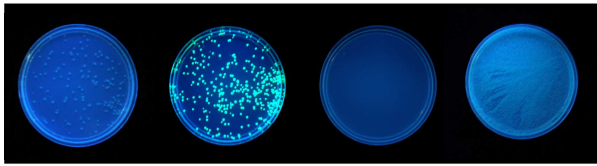
テキスト45ページ

41

pGLOプラスミドと遺伝子発現調節

42

実験結果: 遺伝子発現調節



+DNA LB/amp/ +DNA LB/amp/ara -DNA LB/amp -DNA LB

+DNA pGLO導入実験
遺伝子組換え実験 (組換えDNA実験)

-DNA pGLO未導入実験
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

高等学校での遺伝子組換え実験

目的: 遺伝子組換え技術を用いたGFP発現調節の実験を行う。遺伝子組換え技術を用いて、遺伝子組換え細胞を培養し、GFP発現を観察する。

材料: 大腸菌感受性細胞株 (E. coli)、プラスミド、アンプシリン、アクリロアミド、グルコース、酵母エキス、LB培地、LB培地+アクリロアミド、LB培地+グルコース、LB培地+グルコース+アクリロアミド、LB培地+グルコース+アクリロアミド+アンプシリン、LB培地+グルコース+アクリロアミド+アンプシリン+GFPプラスミド、LB培地+グルコース+アクリロアミド+アンプシリン+GFPプラスミド+araCプラスミド、LB培地+グルコース+アクリロアミド+アンプシリン+GFPプラスミド+araCプラスミド+GFPプラスミド。

実験手順:

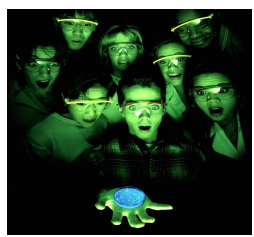
- 大腸菌感受性細胞株をLB培地に培養する。
- プラスミドを細胞に導入する。
- 細胞をLB培地+アクリロアミドに培養する。
- 細胞をLB培地+グルコースに培養する。
- 細胞をLB培地+グルコース+アクリロアミドに培養する。
- 細胞をLB培地+グルコース+アクリロアミド+アンプシリンに培養する。
- 細胞をLB培地+グルコース+アクリロアミド+アンプシリン+GFPプラスミドに培養する。
- 細胞をLB培地+グルコース+アクリロアミド+アンプシリン+GFPプラスミド+araCプラスミドに培養する。
- 細胞をLB培地+グルコース+アクリロアミド+アンプシリン+GFPプラスミド+araCプラスミド+GFPプラスミドに培養する。

観察結果: 細胞はLB培地+アクリロアミドに培養したときに発光し、LB培地+グルコースに培養したときに発光が抑制される。

高等学校「生物」(東京書籍)

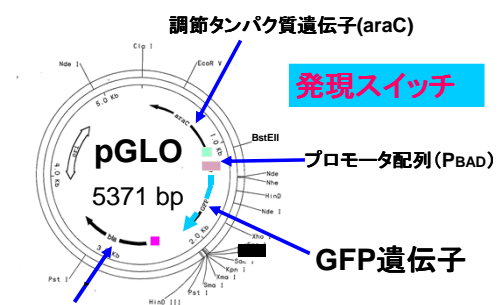
※アンプシリンは、菌に耐性のためオートクレーブ処理後添加する。

東京農工大学遺伝子実験施設 第16回「教員のための遺伝子組換え実験教育研修会」 形質転換・実験結果と考察

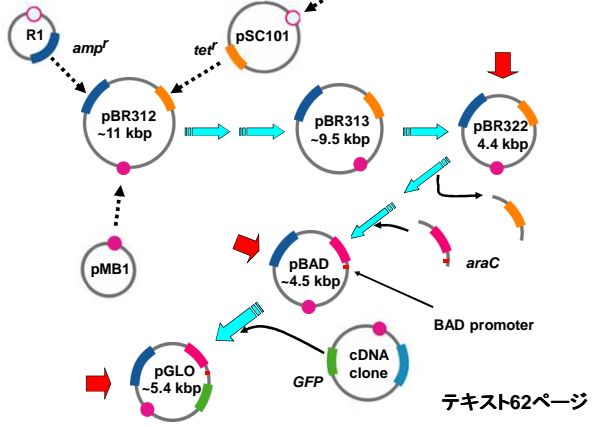


おおとう みちえい
大藤 道衛

プラスミドDNA pGLOの構造



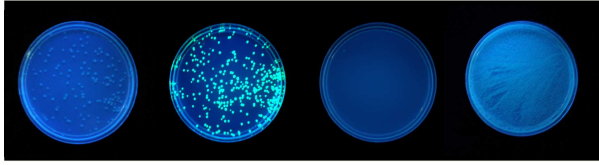
pGLOプラスミドの起源



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 遺伝子
Heredity Gene

実験結果: 遺伝子発現調節



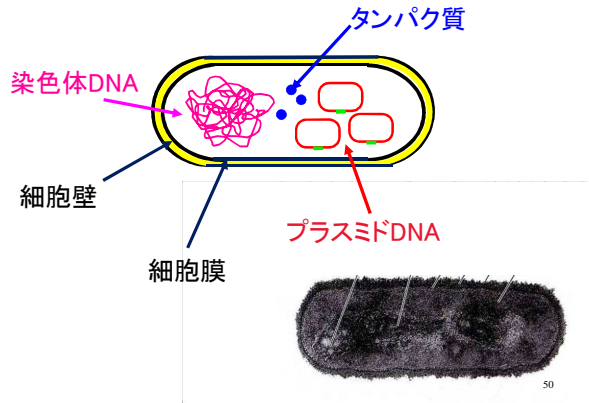
+DNA LB/amp/ LB/amp/ara -DNA LB/amp LB

+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)

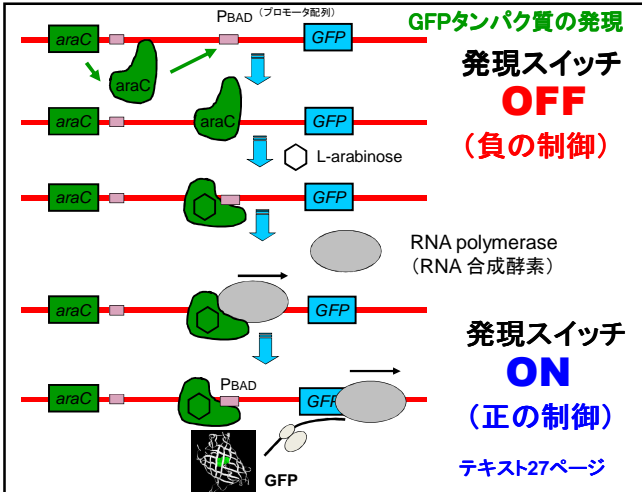
テキスト48ページ

大腸菌の構造

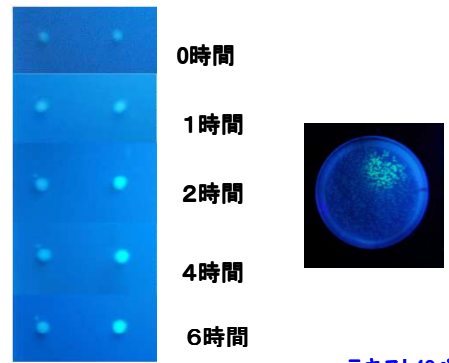


50

GFPタンパク質の発現



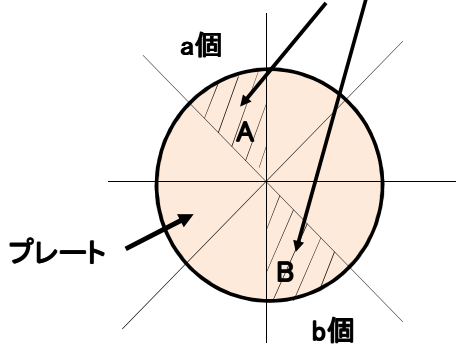
GFPの発現



テキスト49ページ

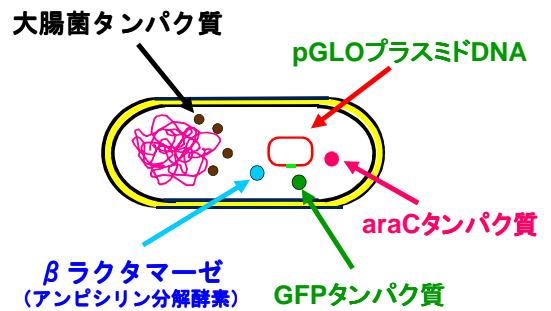
コロニー数測定

プレートを8等分し、A,B 2箇所のコロニー数測定



全コロニー数 = $4 \times (a + b)$ 個 テキスト46ページ

組換え大腸菌での遺伝子発現



テキスト25ページ

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

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

↑
プラスミドDNA 1 μg 当たりのコロニー数

テキスト64ページ

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)

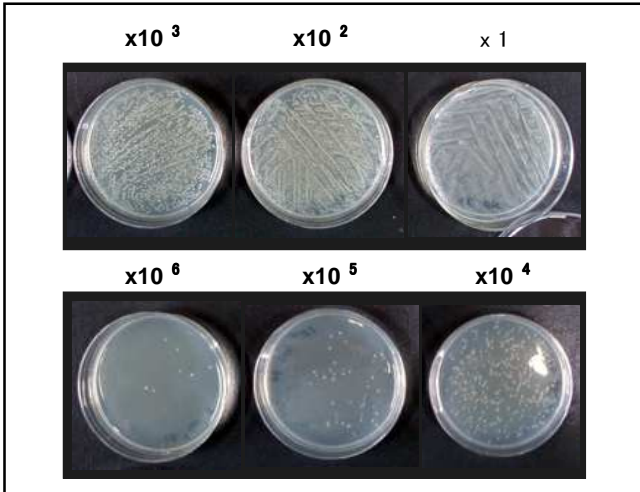
250 μL TF soln. (*E. coli*)
250 μL LB broth
10 μL pGLO soln. } 510 μL

菌数測定:
チューブ内菌数
→プレート添加菌数

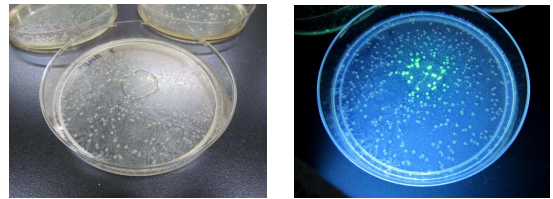
X10 X10 X10

形質転換コロニー数 x100
プレート添加菌数
=形質転換頻度(%)

テキスト65ページ



蛍光の持続力



2-8 $^{\circ}\text{C}$ (低温室) 12週間放置
培地乾燥状態

実験の準備

実習の準備1: 培地作製

寒天培地溶解 ラベル表示 攪拌後分注

注意: アンピシリン・アラビノースは、
ボトルを手で触れる温度で添加

テキスト33ページ

Luria-Bertani (LB) medium

Lysogeny Broth medium

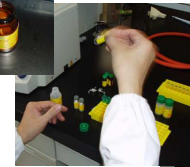
トリプトン(Bacto-Tryptone) 1% (w/v)
酵母エキス(Yeast Extract) 0.5% (w/v)
塩化ナトリウム (NaCl) 1% (w/v)

実習の準備2: 試薬分注



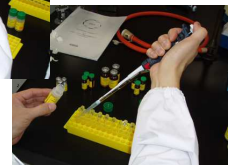
ラベル表示

凍結乾燥品の溶解



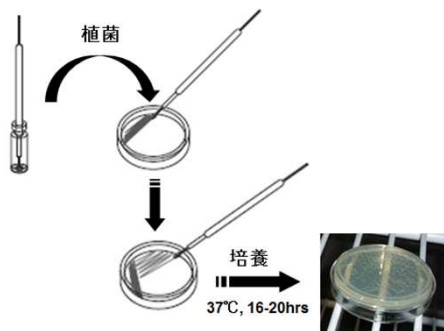
攪拌

分注



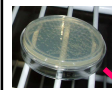
テキスト34ページ

スタープレート作製の作製



テキスト35ページ

実験台



大腸菌(スタープレート)



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

64

廃棄物処理

オートクレーブ



圧力釜



オートクレーブバッグ



テキスト50ページ