

29 遺伝子組換え

目的 一発光タンパク質の遺伝子(GFP)の大腸菌への導入ー

今回の実験では、オワンクラゲという光るクラゲの遺伝子(GFP)をプラスミドを用いて組込み、光る大腸菌をつくる。この実験でバイオの基本技術である遺伝子組換えの基本を学ぶ。

準備

<p>●1班あたり(今回は1人分)</p> <ul style="list-style-type: none"> □ 大腸菌スタープレート(大腸菌が育っているLB培地)…1枚 □ 緑チューブ(→ +DNAと書く)…1本 □ 青チューブ(→ -DNAと書く)…1本 □ 黄色チューブ(液体LB:液体が入っていることを確認) □ 紫色チューブ(形質転換溶液:液体が入っていることを確認) □ 寒天培地プレート(次のものが4枚) <ul style="list-style-type: none"> ・LB…1枚 ・LB/a m p…2枚 ・LB/a m p/a r a…1枚 □ 植え付け用ループ(黄色)…1パック □ 使い捨てピペット…5本 □ チューブをさすラック…1個 □ 油性のマジックペン □ ビニールテープ 	<p>●全体で準備</p> <ul style="list-style-type: none"> □ pGLOプラスミド溶液 □ 42℃に温度調整したウォーターバス[ヒートショック用] □ 37℃に温度調整したインキュベーター(恒温器)[培養用] □ UVランプ □ 電子レンジ □ 測定可能な温度計 □ 500 mL フラスコ…2つ □ 500 mL 目盛りつきシリンダー…1つ □ 蒸留水 1000 mL / 1キット □ クラッシュアイスとボックス…各班 □ オートクレープ または 圧力釜 □ 使用済みピペットやループを入れるための容器…8つ □ 実験用白衣(必要であれば) □ ゴーグル(UVから目を保護) □ 70%エタノール □ ガスバーナー
--	--

*あることが確認できたら、□ に✓を入れよう。

※実験上の約束事

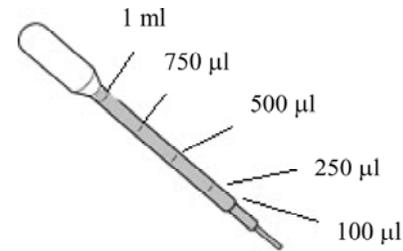
1. 実験中はドア・窓を開けない。
2. 実験室に食べ物を持ち込まない。
3. 実験後手を殺菌する。

※実験の基本的注意

1. 各自、消毒液で手を洗浄する
2. 70%エタノールで実験台をふく。
3. 実験中はなるべく話をしない。特にチューブのふたを開けているときは注意。

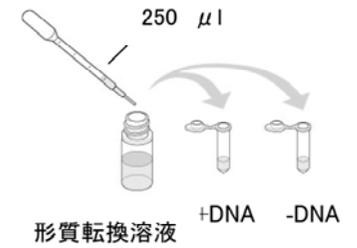
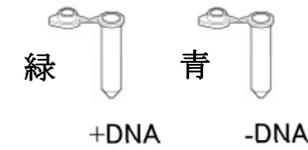
(だ液には雑菌やDNA分解酵素が含まれている)

●使い捨てピペットの容量

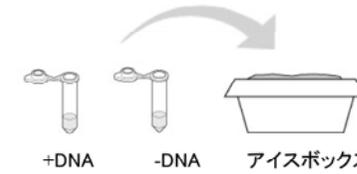


方法

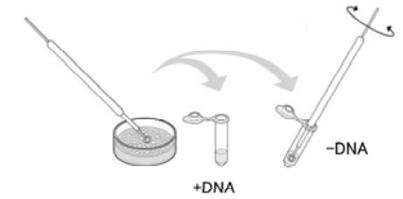
1. チューブのフタに名前を書く。
 緑のチューブ +DNA
 青のチューブ -DNA
2. +DNA, -DNAそれぞれのチューブに250 µLずつの形質転換溶液を入れる。



3. チューブをラックに入れ、氷上に5分間、静置する。

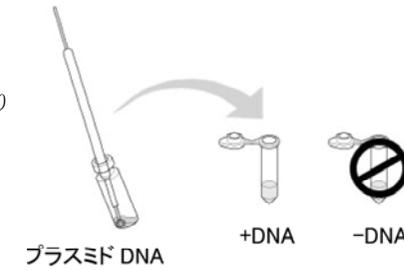


4. スタープレートより、大腸菌を3個とる。
 *このとき、+DNA, -DNAも必ず同じ数の大腸菌を採る。

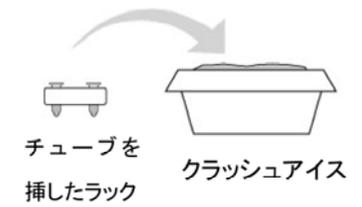


5. プラスミドを1ループとり +DNAのみに加える。

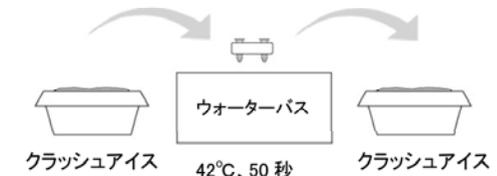
*膜が張っていること必ず確認。



6. チューブをラックに入れ、氷上に10分間、静置する。

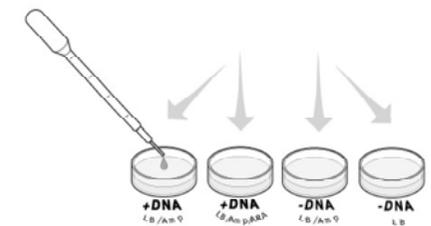


7. 42℃で50秒間熱を加える。
 *すぐに、氷上に戻し、2分間静置する。



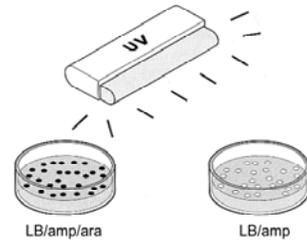
8. LB-BROTHを250 µL加え、10分間室温に置く。
 *油性ペンでプレートのフタの丸みに沿って、名前を小さく書く→実験結果が観察しにくくなる。

9. チューブから100 µLをとり、均一に広がるようにプラスチックループで広げる。
 *強くひっかくと培地に傷が付いてしまうので軽く広げる。
 *雑菌が入らないように手早く行い、確実にフタを閉める。



10. 37℃で24時間, 培養する。

11. 可視光, UVでプレートを観察する。



結果

1. 4つのプレートを観察し, スケッチしなさい。また, それぞれの様子を観察し課題で答えたことを参考にして下に記入しなさい。

プレート種類	プレートの様子	普通の光で観察 (コロニー数や色, 形, 気づいたことなど)	紫外線を当てて観察 (光るコロニー数や気づいたことなど)
① - DNA LB		<ul style="list-style-type: none"> ・数 ・色 ・形 ・その他 	
② - DNA LB/amp		<ul style="list-style-type: none"> ・数 ・色 ・形 ・その他 	
③ + DNA LB/amp		<ul style="list-style-type: none"> ・数 ・色 ・形 ・その他 	
④ + DNA LB/amp/ara		<ul style="list-style-type: none"> ・数 ・色 ・形 ・その他 	

2. それぞれのプレートにはどの程度コロニーが生えているか。

3. 普通に見たときコロニー(大腸菌)の色は何色か。

4. 紫外線を当てると光るコロニーはどのプレートにできているか。

5. 遺伝子が組込まれた大腸菌がアンピシリンの入った培地上でもコロニーを作れるのはなぜか。

6. DNA (pGLOプラスミド) にUVを当てると光るか。

7. アラビノースが入っていない培地上では遺伝子を組込まれた大腸菌でも光らないのはなぜか。

8. 光る大腸菌ができるのは大腸菌の中に何が作られたからか。

9. もともとの大腸菌(遺伝子を組込んでいない-DNAと書かれた物)および遺伝子が組込まれず, 形質転換できなかった大腸菌が生育できるプレートはどれか。

10. 抗生物質の性質を確かめるためには, どのプレートを比べればよいか。

11. 形質転換が成功した大腸菌(プラスミドが入った+DNAと書かれた物)がコロニーを作れるプレートはどれか。

12. アンピシリン抵抗性を持つ形質に転換されたか(遺伝子が入ったか)を確認するためには, どのプレートを比べればよいか。

13. 遺伝子は, ある特定の状況の下でなければ働かない場合がある。それは, どのプレートを比べればよいか。

実験後の処理

1. 実験に使ったプレート, ループ, ピペットなどはすべてオートクレーブに入れ滅菌処理をする。
2. 遺伝子を組換えた大腸菌は実験室外に持ち出さない。

実験の反省・感想

クラス _____ 番号 _____ 氏名 _____

◆◇◆ 遺伝子組換えについて ◆◇◆

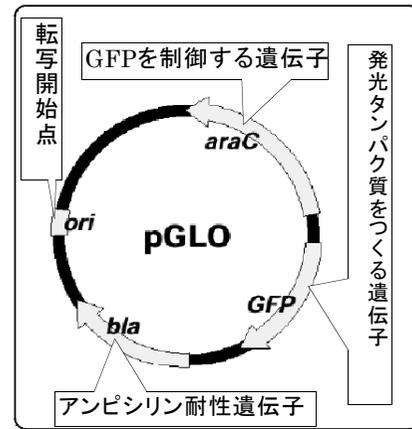
遺伝子組換えとは・・・

ある生物から目的とする遺伝子を取り出し、改良しようとする生物にその遺伝子を入れることにより、新しい性質をもつ生物にすることを言う。

遺伝子組換えは、バイオ技術の基本であり、すでに大腸菌によって人のインシュリンを生産するなど医学や農学など広い分野で活用されている。今後、現在の医療では治療することの出来ない重篤な疾患にも回復の兆しが見える技術である。

実験概要

1. 大腸菌を形質転換溶液に入れて、プラスミドを入りやすくする。
2. 大腸菌とプラスミドを混ぜ、ヒートショックを与える。(ヒートショックでプラスミドは大腸菌内に入る。)
3. ヒートショックを与えた大腸菌に液体培地(LB-BROTH)を入れて休ませ、ヒートショックから回復させる。
4. 回復した大腸菌をアンピシリンの入った寒天プレート(寒天培地)にまく。
5. 恒温器にて、大腸菌を37℃で24時間培養する。プラスミドが入った大腸菌は、アンピシリンに強くなっているののでアンピシリンが入った培地でも生育できる。
6. 今回のGFP遺伝子は、アラビノースが存在するときだけ働く。このため、アラビノースの入った培地にまかれた大腸菌だけが発光タンパク質を作ることができる。
7. GFPを生産している大腸菌のコロニーに紫外線を当てると緑色に光る。



組込むプラスミド

【用語】

- ・ GFP … (Green fluorescent Protein) 緑の蛍光を発するタンパク質。
- ・ pGLO … 発光タンパク質をつくるプラスミド。
- ・ アラビノース … (ara)糖の一種。今回はpGLOのスイッチを入れる役目。
- ・ アンピシリン … (amp)抗生物質(殺菌剤)の一種。ペニシリンの仲間。
- ・ LB … 培養用の栄養。今回は寒天培地となっている。
- ・ LB-BROTH … 液体の培地
- ・ コロニー … 寒天培地上にできた大腸菌の塊。丸い斑点のように見える。
- ・ コンピテントセル … プラスミドが入りやすくなった状態の大腸菌。
- ・ プラスミド … 大腸菌などの細菌の中で染色体とは別に存在する環状二本鎖DNA。遺伝子を運ぶための物質。ベクター。

教員が事前に準備しておくこと

- 培地作り(LB, LB/amp, LB/amp/ara) 添付の作成マニュアルに作成手順が掲載
- 人数分のラック, ラックへ4本のチューブ(緑・青・紫・黄)を立てる
- 形質転換溶液の分注(700 μ Lずつ) → 紫チューブ
- LB-BROTHの分注(700 μ Lずつ) → 黄チューブ
- pGLOプラスミド溶液(250 μ L, 最大で500 μ Lを添加しても実験可)
- クラッシュアイスの準備
- 関係者以外立ち入り禁止(実験室に貼る), LMO保管中(恒温器に貼る)の張り紙の作成

TIPS

- ・ 生徒は、ピペットの使い方が不得手である。事前練習が望まれる。
- ・ 教員は、マイクロピペットで溶液を分注すると、準備が容易である。
- ・ 恒温機は、実験前日から電源を入れ、温度計を内部に入れておく。恒温機の外部表示と内部温度が実際とは異なる場合があるため、内部温度を必ず確認する。
- ・ プラスミドは、作業効率を上げようとして分注しない。ループに膜が張れなくなってしまう。
- ・ どんなに、この実験に慣れても予備実験は行ったほうがよい。なぜならば、実験手順に問題がなくても、梱包されている試薬がまれに失活している場合がある。また、予備実験を行った試料で、実験がうまくいかなかった子に対応もできる。
- ・ クラッシュアイスがない場合は、紙コップに氷を入れて冷やしても行える。
- ・ プラスミドは、250 μ Lで溶解することになっているが、500 μ Lで溶解しても十分に実験に用いることができる。
- ・ クラッシュアイスの準備が難しければ、紙コップに氷を入れて用いても代用可能。
- ・ プラスミドを採るとき、ループに膜が張っていることを必ず確認する。
- ・ 近隣の大学に援助を要請 教育学部, 理系学生の教員志望に協力要請して実験を行うと楽しい。

この実験を行う前に学んでおきたい内容

- ・ 遺伝子の構造
- ・ セントラルドグマ
- ・ 形質転換
- ・ DNAと遺伝子の関係
- ・ オペロン説
- ・ DNA工学

参考資料

- ・ 教育目的組換えDNA実験(講義と実習) 東京テクニカルカレッジ・バイオテクノロジー科講師 大藤 道衛 2005
- ・ その道の達人 遺伝子組換えの達人 講義資料 筑波大学遺伝子実験センター教授 鎌田 博 2006
- ・ 遺伝子組換え実験 実験プリント 東京都立新宿高校 佐藤 由紀夫 2005

今回の遺伝子組換え実験はBIO-RAD社の製品を用いた。