

2020 年度 化学・バイオ工学実験 A

実験課題

テーマ J

3.7 微生物学の基本操作

3.8 植菌操作および微生物からの核酸の調整

3.9 P C R による遺伝子の増幅

視聴日 2020 年 7 月 14 日・15 日・16 日

提出日 2020 年 7 月 21 日

B8TB3040 齊藤依緒

3.7 微生物学の基本操作

1. 実験の目的

今回のような生物系実験では、病原性を持ちうる細菌類を取り扱うことがあり、また手や空気中に常在している細菌類が実験に大きく影響する (コンタミネーション)。そのため、滅菌・無菌操作など他分野の実験には無い操作が不可欠となる。今回の実験は、身近な細菌である手指の常在菌・また空気中の浮遊細菌を培養することで生物系実験の基本操作である滅菌・無菌操作・細胞培養を習得する。

また、昨今の新型コロナウイルス感染症の流行から、手指等の消毒が重要視されている。今回の実験ではオスバン液・アルコールによる手指消毒の効果を細菌培養により考察する。

2. 実験操作

2.1 試薬等

- LB 平板培地 (三枚)
- オスバン液
- 70% エチルアルコール

2.2 実験操作

■手指の常在菌の培養

まず、消毒を行わない状態で LB 平板培地に指を押しつけ、オスバン液・70 %エチルアルコールで消毒を行った状態でもう一度同じ操作をした。このとき、指を押しつけた場所が重ならないように培地に円状の印を 4 つ付け、上半分に無消毒・下半分に消毒済の指を押し付けた。同様の操作を二人で行い、計 4 条件のサンプルを採取した。これらすべての操作をクリーンベンチ内で行った。その後、30℃で培養した。

■空中落下細菌の培養

LB 平板培地を野外に持ち出し、5 分間シャーレの蓋を開放することで空中落下細菌を採集した。これを二か所で行い、採集したサンプルを 37℃で 48 時間培養した。

採集場所は実験棟裏のごみ置き場 (サンプル 1)・実験棟前の桜の木の下 (サンプル 2) の二か所であり、気象条件は曇り・ほぼ無風であった。

3. 実験結果と考察

各実験における培養後のシャーレの様子を以下の図 1~3 に示す。



図1 手指の常在菌

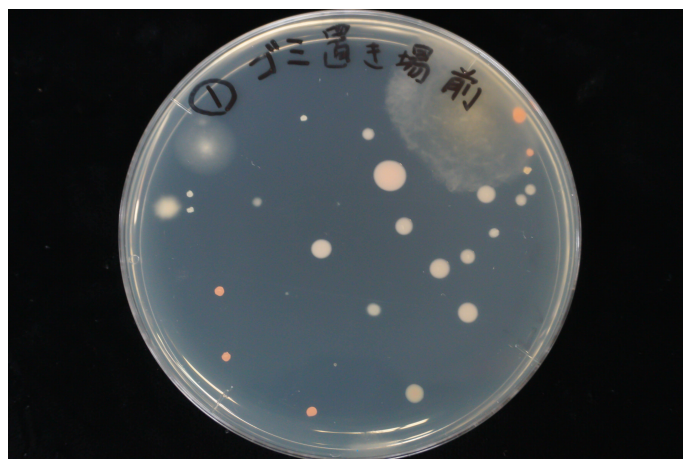


図2 空中落下細菌 サンプル1

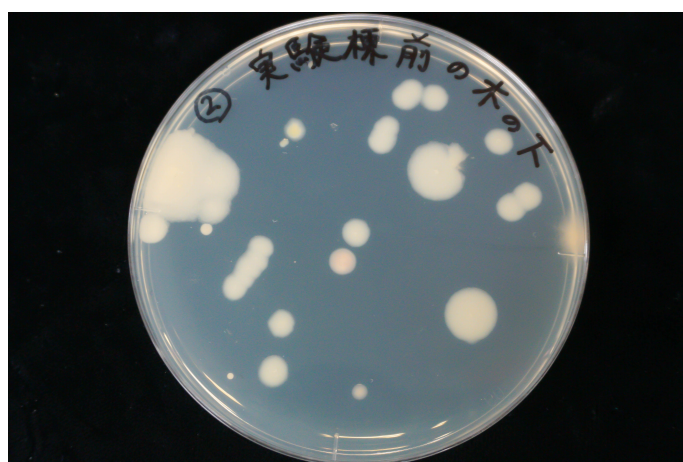


図3 空中落下細菌 サンプル2

図 1 の観察結果を以下の表に示す。

サンプル	コロニーの特徴	コロニー数
1-消毒前	乳白色・円形～不定形	10
2-消毒前	乳白色・円形	7
	黄色・円形	7
1-消毒後	—	0
2-消毒後	—	0

サンプル 2-消毒前において見られた黄色・円形のコロニーは黄色ブドウ球菌、共通して見られた乳白色のコロニーは表皮ブドウ球菌のものであると考えられる。

また、両サンプルにおいて消毒後はコロニーが観られなかった。これは消毒により菌がコロニーを形成できなくなる数まで減ったためと推察でき、消毒の効果があったと言える。

図 2,3 の観察結果を以下の図に示す。また、落下菌数の判定は衛生試験法の基準に基づき行ったものである。

サンプル番号	採集場所	コロニー数	判定	コロニーの種類
1	ゴミ置き場	27	A	薄く広がった黄褐色のもの 橙色, 円形, 輪郭の明瞭なもの 乳白色, 円形, 輪郭の明瞭なもの 乳白色で境界の不明瞭なもの
2	桜の木の下	20	A	乳白色・境界の明瞭なもの (複数のコロニーがつながったもの)

4. 設問への回答

3 節参照

3.8 植菌操作および微生物からの核酸の調整

1. 実験の目的

この実験では、大腸菌の培養と細胞破碎・さらに核酸の調整を行う。細胞培養においては、調整・滅菌した培地に無菌的に菌を植えることが最も重要である。また、細胞内分子や核酸を取り扱う実験においては、これらの目的とする分子を細胞から取り出さなくては反応や解析を行うことができない。ゆえに細胞破碎法が用いられる。

今回の実験はこれらの操作の意味を理解することを目的としている。また、調整した核酸溶液は 3.9 の PCR による遺伝子の増幅にもちいる。

2. 実験操作

2.1 実験材料

- 培地
 - *Bacto-peptone* :0.5g
 - *yeast-extract* :0.5g
 - NaCl :0.25g
- 水溶液
 - TE 溶液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH=7.5)
 - SDS 溶液 (10%)
 - NaCl 溶液 (5M)
 - CTAB 溶液 (10% セチルトリメチルアンモニウムブロマイド, 0.7M NaCl)
 - MgCl₂ 溶液 (1M)
 - CH₃COONa 溶液 (3M, pH=5.2)
- 有機溶媒
 - 2-プロパノール
 - クロロホルムーイソアミルアルコール混合溶液 (24:1)
- 酵素溶液
 - プロピナーゼ K 溶液 (20mg/ml)
 - DNase 溶液 (10mg/ml)
- 大腸菌 (*Escherichia coli*)

- 蒸留水

2.2 実験操作

今回行った実験操作を以下の図 1~4 のフローチャートに示す。桃色のノードは使った試薬等, 青色は使用した器具, 紫色は操作を示す。

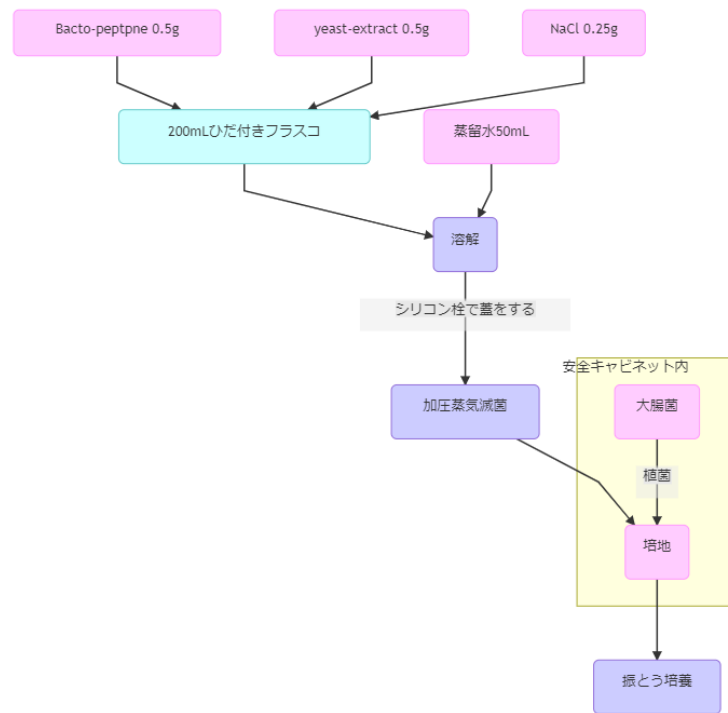


図 1 大腸菌培養

1. 200mL ひだ付きフラスコに *Bacto-peptone* を 0.5g、*yeast-extract* を 0.5g、NaCl を 0.25 入れ、50 mL の蒸留水に溶解させた。
2. フラスコにシリコン栓で蓋をしたのち、120 °C で 20 分加圧蒸気滅菌を行い培地を滅菌した。
3. 滅菌したフラスコの口をバーナーで炙ってからシリコン栓を外し、同様にシリコン栓・フラスコの口を炙ってから培地に大腸菌を加え、逆の操作でシリコン栓で蓋をした。この操作は安全キャビネット内で行った。
4. 3 で植菌した培地を 37 °C に保ったまま 120rpm で一晩振とうし、大腸菌を培養した。
5. 4 の培養液を 40 mL 遠心分離用のチューブに移し、6000G で 10 分間遠心分離した。
6. 菌体を崩さないように上清を破棄した後、底にたまった菌体に 9.5mL の TE 溶液を加え、軽く振って懸濁させた。
7. 懸濁液に SDS 溶液を 0.5 mL、プロテナーゼ K 溶液を 50 μ L 加え、振り混ぜた後 37 °C で 30 分反応させた。
8. 7 の反応溶液に NaCl 溶液を 1.8mL、65 °C に予温した CTAB 溶液を 1.5mL 加え、攪拌の後 65 °C で 20 分反応させた。

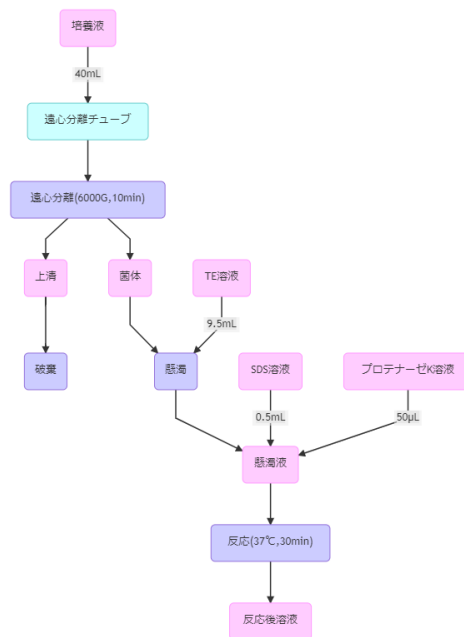


図2 細胞破碎法

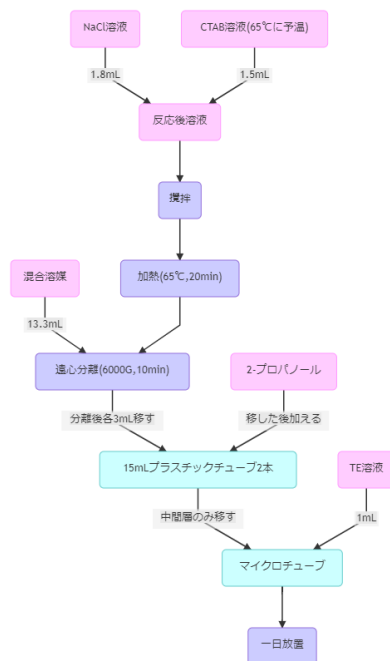


図3 DNA抽出操作1

9. 反応後の溶液にクロロホルムーイソアミルアルコール混合溶液を 13.3mL 加え、6000G で 10 分間遠心分離を行った。
10. 15 m L のプラスチックチューブ二本に各 3mL ずつ 9 の溶液をうつし、それぞれに 2-プロパノールを 2 m L 加えて混合した。
11. 三層に分かれたのち、上層を吸い出し中間層のみをそれぞれ別のマイクロチューブに移した。これにそれぞれ TE 溶液を加え、一晩放置した。

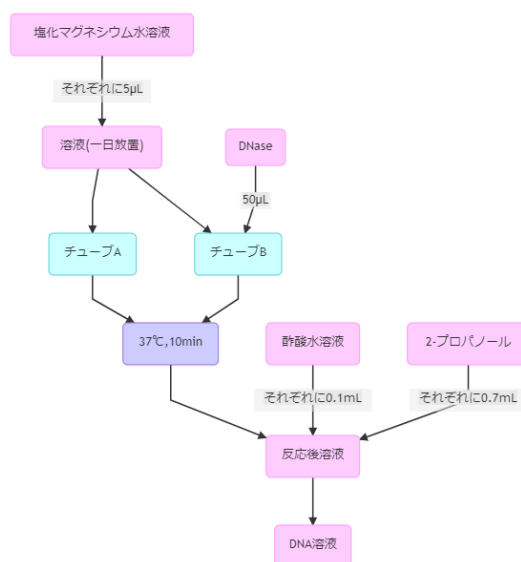


図4 DNA抽出操作2

12. 11 のそれぞれのチューブに MgCl_2 溶液を 5 μL 加え、片方には DNase 溶液を 50 μL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間反応させた。反応後の溶液にそれぞれ酢酸水溶液を 0.1mL, 2-プロパノールを 0.7 μL 加えて攪拌し、これを DNA 溶液とした。

3. 観察結果と考察

- 操作 4 で一晩培養したのち、培地は黄褐色透明 → 同じ色で懸濁と変化していた。
- 操作 5 の遠心分離ののち、溶液は上精が黄褐色でやや懸濁、そこに白色の沈殿という状態であった。
- 操作 7 の後、再懸濁によって乳白色に濁っていた溶液は少し濁りが薄くなったが、同様に乳白色に濁っていた。
- 操作 9 の後、溶液はやや白濁した上層・白色固体の中間層・上層よりも濁りの薄い下層に分層した。
- 操作 10 の後、溶液中に白色の薄い膜のような固体が析出した。
- 操作 11 の後、両方の溶液は無色透明となっていたが、操作 12 の後、DNase を加えなかった溶液は白色の糸状のゲノム DNA の析出が見られたが DNase を添加した溶液では見られなかった。

4. 設問の回答

1. 操作・薬品の意味

- *Bacto-peptone, yeast-extract, NaCl* → 培地に細菌成長に必要な炭素源・窒素源・電解質を供給する。
- TE 溶液 (バッファー) → TrisHCl は以下の構造を持ち、後のタンパク質分解反応等において最適な pH を維持するために添加する。また、EDTA は Mg^{2+} に対するキレート剤で、核酸分解酵素 DNase が働く際に必要となる Mg^{2+} を捕捉することで核酸分解を止める働きがある。
- SDS 溶液 → 12 炭素からなるアルキル基が硫酸に結合した構造を取り、両親媒性である。両親媒性物質は界面活性剤として脂質二分子膜構造を破壊する。
- プロテナーゼ K 溶液 → 大腸菌の細胞壁であるペプチドグリカン破壊するタンパク質分解酵素である。
- CTAB 溶液 → SDS 溶液と同様の両親媒性物質だが、正に帯電しているため負に帯電している DNA から糖やタンパク質を遊離させ、DNA を単離する働きがある。塩濃度が低いと DNA-CTAB 複合体が沈殿するため NaCl を加える。

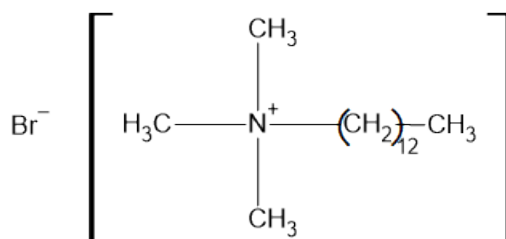


図5 CTAB 構造

- クロロホルムーイソアミルアルコール混合溶液 (24:1) → 分液用の溶媒である。DNA は負に帯電していることから水層に移動し、脂質などは有機層に移動する。また、この溶媒はタンパク質を変性させる働きがあり、これにより変性したタンパク質が中間層に析出する。
- 2-プロパノール → DNA を塩析により析出させる。
- TE 溶液、 $MgCl_2$ 溶液 → 後に行う DNase による核酸の分解反応に最適な条件を作り出す。
- DNase → 比較対象実験として片方の DNA を分解し、析出したものが DNA だったのかを判別するのにもちいる DNA 分解酵素である。

2. 大腸菌の分類

分類法	大腸菌の分類
三界説	原生生物界
五界説	モネラ界
三ドメイン説	原生生物界
グラム染色	陰性

3. DNA の構造

DNA は下の図のような二重らせん構造をもち、生物に必要な遺伝情報 (ゲノム) を四種類の塩基でコードしている。塩基は A と T、C と G が相補的に水素結合するような構造になっており、これにより一本の DNA を鋳型として全く同じ DNA を複製することが可能である。

また、ゲノムは本来生物に必要なタンパク質のアミノ酸配列を記録したものであり、これが形質に影響を与えることから遺伝情報として扱われる。DNA からタンパク質を合成する過程を翻訳と言い、これも相補的な塩基を利用したものである。

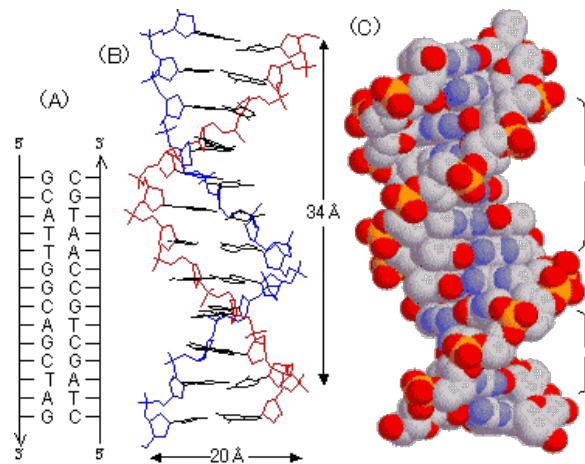


図6 DNA 構造

5. 参考文献

図の出典

<http://www.sc.fukuoka-u.ac.jp/~bc1/Biochem/nuclacid.htm>

核酸の構造

3.9 PCR による遺伝子の増幅, 微生物同定

1. 実験の目的

今回の実験では PCR 法による DNA の増幅、電気泳動法による DNA の解析を行う。遺伝子工学においては目的の DNA 配列が最重要であるが、当然ながら DNA は肉眼で確認することが不可能である。PCR 法は **Polymerase Chain Reaction** の略であり、後述の電気泳動法による分析が可能な数まで目的の DNA を増やすために行う。

まず、試料の二本鎖 DNA を熱により変性させて一本鎖とし、これに適切な温度でプライマーを結合させる。その後、DNA 伸長が可能な温度下で反応を行うと、試料 DNA を鋳型とした二本鎖 DNA (プライマーを持つ) が 2 セットできる。この変性 → プライマー結合 → 伸長を 1 サイクルとする。

1 サイクル目で得られる DNA は目的の配列よりも長いものである。同様に 2 サイクル目を行うと、一組で得られた二本鎖 DNA のそれぞれの鎖が新たな二本鎖 DNA の鋳型となり、片方の鎖が鋳型 DNA のものが 2 組、片方の鎖にプライマーが二つ、もう片方にはプライマーが一つの二本鎖 DNA が 2 組、計 4 組の二本鎖 DNA が得られる。3 サイクル目も同様に行うと両方の鎖にプライマーを二つずつ持つ目的の DNA が 4 組得られる。このようにして目的の DNA を増幅する方法が PCR 法である。

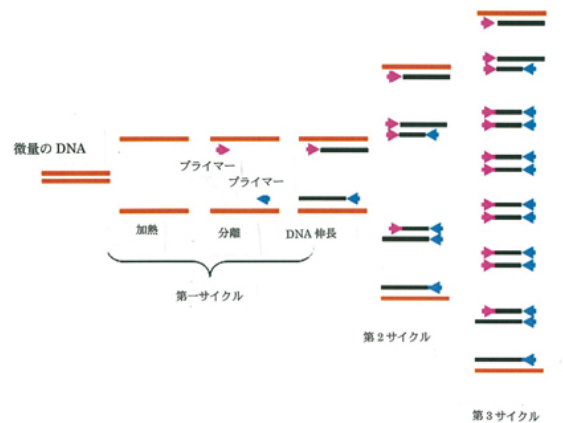


図 1 PCR 模式図

電気泳動法は DNA の分子量とアガロースゲル中の移動度の関係を用いて DNA を分離する方法であり、薄層クロマトグラフィーなどと同じ原理を用いているが、DNA が負に帯電していることを利用し電位勾配で DNA を泳動させていること、DNA の可視化のためにエチジウムブロマイド (EtBr) を用いることが特徴的として挙げられる。EtBr は以下の構造式で表され、DNA の二本鎖の間に入り込んで紫外線下で蛍光を発するため用いられる。

今回の実験では 3.8 で調整した大腸菌ゲノム DNA のうちホスファターゼ遺伝子の増幅を PCR にて行い、電気泳動で解析を行う。また、未知のサンプルにおいても DNA の増幅を行い、電気泳動の結果から微生物を同

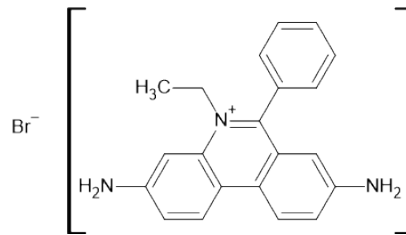


図 2 EtBr 構造式

定する。

2. 実験手順

2.1 試薬

《PCR 反応溶液》

- 鋳型 DNA 溶液 (3.8 で調整したものを 50 倍希釈したもの)
- 10x PCR 溶液
 - 100mM Tris-HCl(pH=8.3)
 - 500mM KCl
- 25mM MgCl₂ 溶液
- dNTP 溶液 (各 2.5mM)
 - dATP,dTTP,dGTP,dUTP
- プライマー (各 10pmol/μ L)
 - プライマー 1: 5'-ttgtcacggccgagacttatag-3'
 - プライマー 2: 5'-ttatttcagccccagagcggc-3'
- *Taq*DNA ポリメラーゼ 2.5U/μ L
- 蒸留滅菌水

ホスファターゼ遺伝子の増幅 (1)・未知サンプルの増幅 (2) それぞれにおける PCR 反応溶液の組成は以下の表のとおりである。微生物同定においては、三種類のサンプルでそれぞれ PCR 反応を行った。

《電気泳動用試薬等》

- 電気泳動用緩衝液
 - 40mM Tris-acetate(pH=8.0)
 - 1mM EDTA
- λ *Hind* III 溶液
- 0.8 %アガロースゲル
- 泳動用色素
 - ブロムフェノールブルー
 - グリセロール

実験	試薬	使用量 [μ L]
1	鋳型 DNA 溶液	1
	プライマー 1	5
	プライマー 2	5
	10x PCR 溶液	5
	dNTP 溶液	4
	<i>Taq</i> DNA ポリメラーゼ	1
	ce{MgCl ₂ }溶液	3
	蒸留滅菌水	25
2	プライマー 1	7
	プライマー 2	7
	10x PCR 溶液	7
	dNTP 溶液	5.6
	<i>Taq</i> *DNA ポリメラーゼ	1.4
	MgCl ₂ 溶液	4.2
	蒸留滅菌水	34.3
	未知サンプル	1

2.2 実験操作

2.1 の表の組成で調整した PCR 反应用溶液を、94 °C:15 秒・60 °C:15 秒・72 °C:30 秒で 30 サイクル反応させた。その後、反応した PCR 溶液四種・3.8 で調整した DNA 溶液・ λ *Hind* III 溶液の計六種についてそれぞれ 10 μ L を 2 μ L の泳動用色素と混合し、100V で 20 分間泳動した。泳動後、UV ランプに当ててバンドの位置を確認・撮影した。各レーンとサンプルの対応は以下の通りである。

レーン	サンプル
1	λ <i>Hind</i> III
2	PCR 反応後サンプル
3	PCR 反応前サンプル
4	未知サンプル 1
5	未知サンプル 2
6	未知サンプル 3

3 実験結果

電気泳動の結果は以下の図の通りであった。

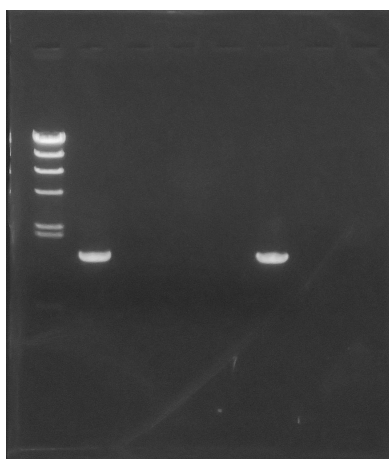


図 3 電気泳動

重合度が既知である λ *Hind* III の移動度は以下の通りであった。また、PCR により増幅した DNA の移動度は 34 mm であった。

泳動距離 [mm]	重合度 [bp]
13.0	23130
17.0	9416
20.0	6557
23.0	4361
29.0	2332
30.5	2027
43.0	564

4 設問の回答

ホスファターゼ遺伝子の増幅について

λ Hind IIIの泳動距離を横軸・重合度を縦軸 (対数軸) として片対数グラフにプロットした。(図 4)

検量線の作成は泳動距離が 13 mm のものを棄却した 6 点を最小二乗法により線形近似して求めたものであり、

$$y = -0.04939794x + 4.80155882$$

の式で表された。以上の式と PCR により増幅した DNA の移動度より重合度 $X[\text{bp}]$ を算出すると、

$$\log_{10} X = -0.04939794 \times 13 + 4.80155882 = 3.1220288$$

$$X = 1324.42932752 \approx 1324$$

となる。

微生物の同定について

レーン 6 に、PCR 反応後サンプルと同じ位置にバンドが見られたことから、未知サンプル 3 が大腸菌を含んでいたと考えられる。PCR 反応後サンプルは、大腸菌を溶菌させてはいるもののすべてのゲノム DNA を含んでおり、大腸菌をそのまま添加した未知サンプルとの条件の違いは溶菌の有無のみである。大腸菌はグラム陰性菌であり、細胞膜の外に直接ペプチドグリカン層が露出している。PCR の反応過程で熱や電解質などにさらされて自然にペプチドグリカン層が破壊され、プラスミドに直接アクセスできる状態が作り出されたと考えられる。数あるゲノム DNA のうち特定の DNA のみが増幅されたのは使用したプライマーに適合する場所が一か所のみであったと考えられる。これは大腸菌が単純なプラスミド DNA を持つ原核生物であることに起因する。

つまり、ヒトや植物といった真核生物において同様の PCR による DNA 増幅を行うと複数のバンドが確認されると推察できる。

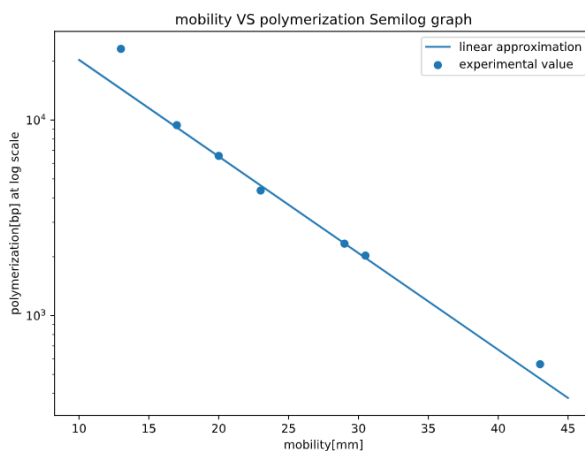


図 4 泳動距離・重合度の関係

5 参考文献

図の出典

PCR 日本 RNA 学会,<https://www.rnaj.org/newsletters/item/471-furuichi-9> 日本 RNA 学会 - <走馬灯の逆廻しエッセイ> 第 9 話「数兆円の経済効果ーPCRの発見」 ”