

# テーマ O プラスミド DNA の制限酵素を用いた切断と連結

B8TB3040 齊藤依緒

2020/11/25

## 課題

(1)

本テーマの操作を用いて、どのような応用が成されているか、ガイダンスの内容を踏まえて、簡潔に記述せよ(400 字程度)。

細菌の持つ遺伝情報は環状のプラスミドに保存されており、細菌はこれらの遺伝子を転写、翻訳、修飾することで生存に必要なタンパク質を合成する。

今回の実験と同様に、細菌の持つプラスミドに特定の配列をコードした核酸をインサートすることができる。有用なタンパク質をコードした核酸をインサートすることで、そのようなタンパク質を合成する細菌を作り出すことができる。

このように、細菌のタンパク質合成経路を用いて酵素、抗体などの有用なタンパク質を人工的に合成することができる。

このようにして合成されるタンパク質は医薬品や研究用の抗体などに用いられる。特に、緑色蛍光タンパク質をはじめとする蛍光タンパク質は、抗体に結合させることで特定の細胞やウイルスの標識となる。また、抗体合成においては細胞を免疫することで得られる抗体はポリクローナル抗体となり、複数の構造を持つ抗体が混ざったものとなる。細菌によるタンパク質合成を用いることで、簡便にモノクローナル抗体を合成することができる。

(2)

抗生物質であるアンピシリンを含む寒天培地上でなぜコロニーが形成されるのか説明せよ。

今回用いたプラスミドは、全てアンピシリン耐性遺伝子を含んでいる。プラスミドの導入が成功した大腸菌はこの遺伝子により  $\beta$ -ラクタマーゼというタンパク質を産生することができ、抗生物質を無害化することができるためコロニーが形成される。

(3)

カラーセレクションの原理を説明せよ。

今回、プラスミド A のマルチクローニングサイトは  $\beta$ -ガラクトシダーゼというタンパク質をコードしている LacZ という遺伝子の部分であった。

今回、大腸菌は X-gal(4-クロロ-3-インドール- $\beta$ -D-ガラクトシド)を含む培地で培養した。インサートが行われなかったプラスミド A を持つ大腸菌は、この X-gal を分解することで青色の物質を産生し、青色のコロニー

を形成する。

一方で、インサートが行われたプラスミドを持つ大腸菌は X-gal を分解できず、白色のコロニーを形成する。この色の違いを用いて形質転換が行われたプラスミドを抽出する方法がカラーセクションである。

(4)

ゲル溶解緩衝液とシリカビーズを用いたプラスミド精製について原理を説明せよ。

負電荷を帯びたリン酸基を持つ DNA、電気陰性度の大きい酸素原子を表面に持つシリカビーズは共に表面に多くの水分子を吸着する。ゲル溶解緩衝液には、水と親和性の非常に大きいカオトロピック試薬が添加されており、シリカビーズ・DNA 表面から水分子を引き剥がす働きがある。この試薬により DNA とシリカビーズが疎水性相互作用で引き合うことで DNA がシリカビーズに吸着され、プラスミドとゲルを分離することが可能である。

(5)

出現したコロニーの中で何%が目的とするプラスミド DNA を保有するコロニーであるかを、計算過程も含めて記述せよ。

(3) のカラーセクションを用いると、白色のコロニーがインサートが成功したプラスミドを持つコロニーである。今回は図 1 のように 97 個のコロニーが出現し、全て白色だったため 100% が目的とするインサートが行われたベクタープラスミドを保有していると考ええる。

(6)

出現したコロニーがすべて白色であると仮定した場合、プラスミド 1  $\mu\text{g}$  あたり何個のコロニーが形成されたか、計算過程も含めて記述せよ、ただし制限酵素の切断効率は 100%, ゲルからの DNA の回収効率は 39%, 連結反応の効率は 55% とする。また制限酵素の切断によりプラスミド A の重合度は変化しないものとし、塩基の平均分子量は 308 とする。

まず、電気泳動を行った時点での A,B それぞれのプラスミドの物質量を求める。(7) の検量線、泳動結果により、得られたプラスミドの塩基対数 [bp], 分子量 [g/mol] は以下の通りであることがわかった。

プラスミド	塩基対数 [bp]	分子量 [g/mol]
A	2325.2	1432323.2
B(ベクター)	2118	1304688
B(インサート)	629.7	387895.2

また、各マイクロチューブに反応溶液が 45 $\mu\text{L}$ , プラスミド溶液を 5 $\mu\text{L}$ , 泳動用色素を 5 $\mu\text{L}$  加え、合計 55 $\mu\text{L}$  の内、各ウェルに 25 $\mu\text{L}$  ずつ添加した。この 55 $\mu\text{L}$  の溶液には、濃度 150ng/ $\mu\text{L}$  のプラスミド溶液 5 $\mu\text{L}$  分のプラスミドが含まれている。このことから、A,B 各レーンに存在したプラスミドは

$$150[\text{ng}/\mu\text{L}] \times 5[\mu\text{L}] \times \frac{25}{55} = 340.9[\text{ng}]$$

と計算された。B では、ベクターとプラスミドそれぞれのバンドが見られた。各バンドに含まれるプラスミド

の質量は分子量の比と一致するため、B(インサート)のプラスミドは

$$340.9[\text{ng}] \times \frac{387895.2}{387895.2 + 1304688} = 78.13[\text{ng}]$$

であったと考える。ゲルからのプラスミド回収効率は 39[%] であることから、A,B インサートのプラスミドはそれぞれ以下の物質質量 [mol] 得られた。

$$A \quad 340.9[\text{ng}] \times \frac{39}{100} \times \frac{1}{1432323.2[\text{g/mol}]} = 9.22 \times 10^{-14}[\text{mol}]$$

$$B \quad 78.13[\text{ng}] \times \frac{39}{100} \times \frac{1}{387895.2[\text{g/mol}]} = 7.86 \times 10^{-14}[\text{mol}]$$

これら全てのプラスミドが 13[μL] の ddH<sub>2</sub>O に溶解出したと考える。A のプラスミドは 13[μL] の内 4[μL], A のプラスミドは 10[μL] を連結に使用したため、連結に用いたプラスミドは A,B それぞれ以下の通りである。

$$A \quad 9.22 \times 10^{-14}[\text{mol}] \times \frac{4}{13} = 2.83 \times 10^{-14}[\text{mol}]$$

$$B \quad 7.86 \times 10^{-14}[\text{mol}] \times \frac{10}{13} = 6.05 \times 10^{-14}[\text{mol}]$$

A のプラスミドと B のインサートは物質質量比 1:1 で連結するため、今回の実験では最大で  $2.83 \times 10^{-14}[\text{mol}]$  のベクターが生じたと考える。しかし、連結効率が 55[%] であることから実際に生じたベクターは

$$2.83 \times 10^{-14}[\text{mol}] \times \frac{55}{100} = 1.5565 \times 10^{-14}[\text{mol}]$$

である。また、連結して生じたプラスミドの分子量は B のインサート部分とプラスミド A の合計であると考えたため、以下の値を用いた。

$$1432323.2[\text{g/mol}] + 387895.2[\text{g/mol}] = 1820218.4[\text{g/mol}]$$

以上から、今回生じたプラスミドベクターの質量は

$$1820218.4[\text{g/mol}] \times 1.5565 \times 10^{-14}[\text{mol}] = 2833169 \times 10^{-14}[\text{g}] \\ \equiv 2.833 \times 10^{-2}[\mu\text{g}]$$

大腸菌の培養により得られたコロニーは (6) の通り 97 個で、全て白だったことから、プラスミド 1[μg] あたりに得られるコロニーは

$$\frac{97\text{個}}{2.833 \times 10^{-2}[\mu\text{g}]} = 3.42 \times 10^3[\text{個}/\mu\text{g}]$$

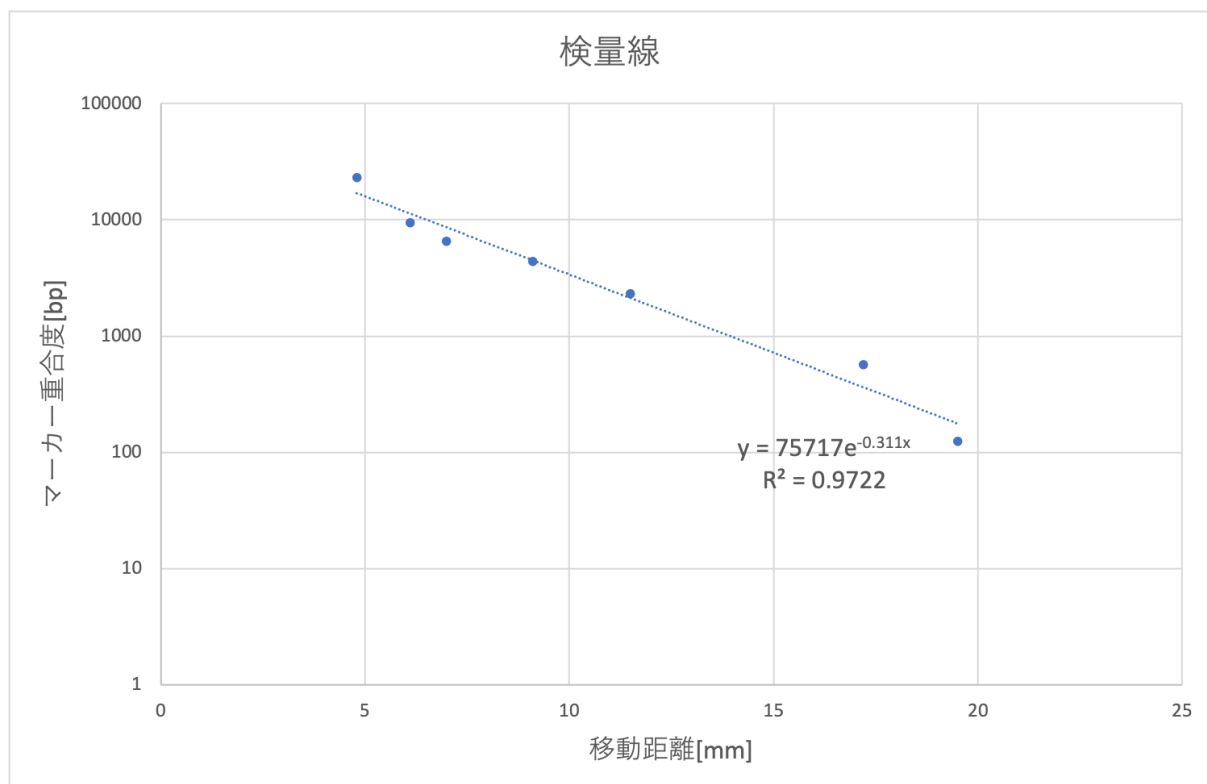
と計算できる。

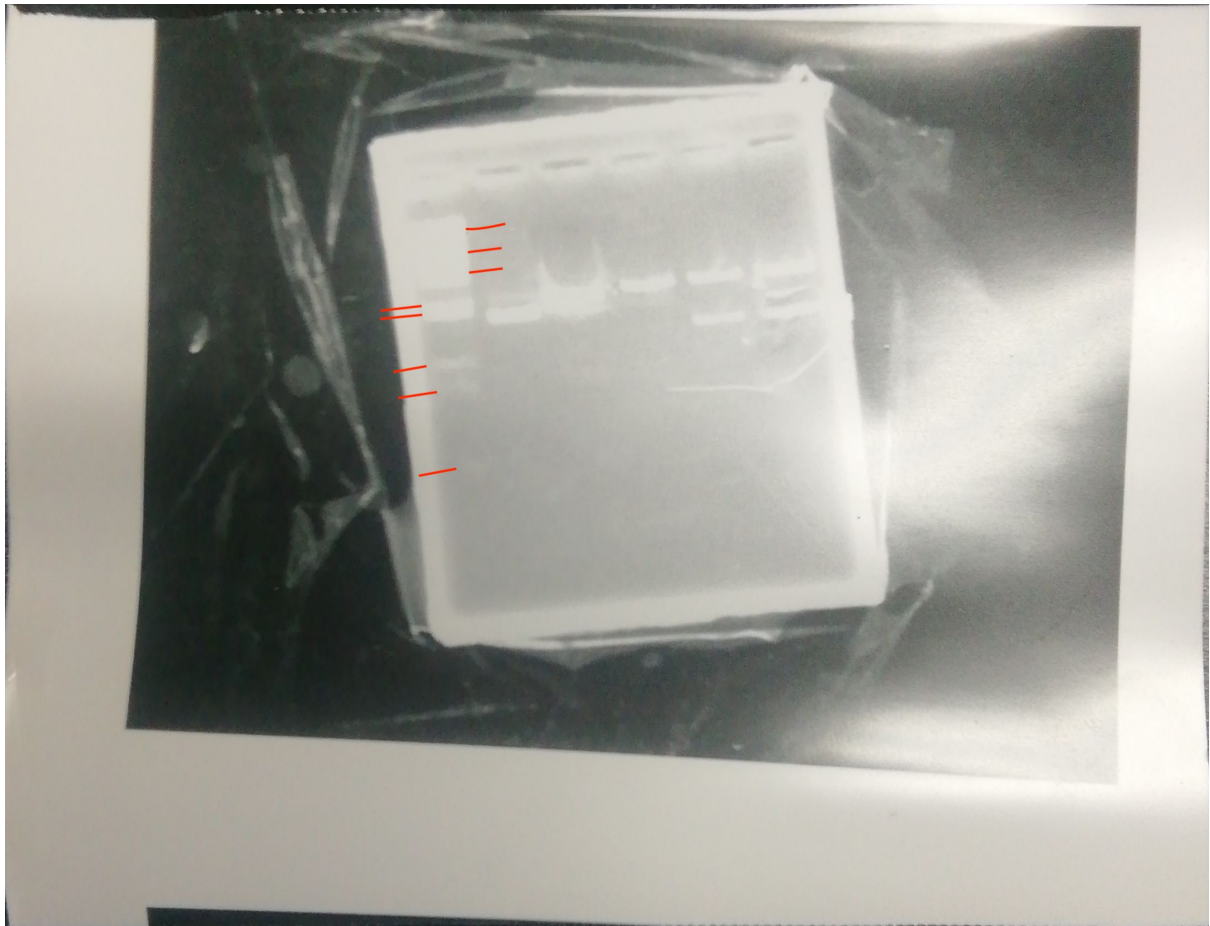
(7)

作成した片対数グラフを使用し、制限酵素処理により生じた各 DNA 断片の重合度を求めよ。

切断されたプラスミド A、プラスミド B(ベクター・インサート) は (6) の通りである。電気泳動の結果は以下の図 2 であり、赤線を引いた重合度マーカーについて移動距離を測定し、片対数グラフを指数関数近似することにより検量線を得た。移動距離の測定結果を以下の表に、グラフと検量線を以下の図 3 に示す。また、移動距離はウェルの上部からバンドの上部までの距離とした。

マーカー [bp]	移動距離 [mm]
125	19.5
564	17.2
2332	11.5
4361	9.1
6557	7.0
9416	6.1
23130	4.8





(8)

制限酵素処理したプラスミド A と未切断のプラスミド A の移動度の差が何に起因するか記述せよ。

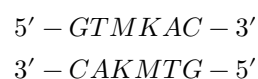
この移動度の差は DNA の幾何的な構造に起因する。

切断酵素処理が行われたプラスミド A は、環の一部が切れることにより直鎖状を取る。一方で未切断プラスミド A は環状構造である。このような環状のプラスミドは、通常、高次の螺旋構造をとり、コンパクトに折り畳まれている。コンパクトな環状プラスミドはアガロースゲルの網目に絡まらないため移動度が大きく、直鎖状の DNA は網目に絡まるため移動度が小さい。

(9)

実際に実験に用いた制限酵素の認識配列と切断様式を記載せよ、またメチル化の影響を受ける配列と、その生物学的意義を記述せよ。

今回用いた *HindIII*, *AccI* は、それぞれ以下のような 6 塩基を認識する。M は A または C、K は T または G である。



*HindIII* は A-A 間を、*AccI* は T-M 間をそれぞれ切断する。*HindIII* は 1 番目の A, 3 番目の G にメチル化が起きている時は影響を受けない (切断がおこる) が、2 番目の A, RNA 状態での 5, 6 番目の U にメチル化が起きている時は切断が起こらない。*AccI* は 2 番目の T、4 番目の K, 5 番目の A にメチル化がおこる可能性があるが、いずれも影響がなく、切断がおこる。メチル化酵素は生物によって固有である。また、制限酵素はその生物種に含まれない異物としての DNA を切断し、働かなくするための一種の防御機構である。そのため、制限酵素がメチル化により配列を切断できなくなる現象は DNA を守るための修飾であると考ええる。一方で、メチル化の影響を受けない (切断される) 配列はその生物種では起こらないメチル化が起こったものと考ええる。各制限酵素について、名称、認識配列、切断様式、メチル化の影響を受ける配列、受けない配列を以下の表に示す。

名称	認識配列	切断様式	メチル化の影響あり	なし
<i>HindIII</i>	5' – AAGCTT – 3'	A-A 間	<sup>6m</sup> AAGCTT	A <sup>6m</sup> AGCTT
	3' – TTCGAA – 5'		AAG <sup>5m</sup> CTT	AAGC <sup>5hm</sup> U <sup>5hm</sup> U
			GTMK <sup>6m</sup> AC	
<i>AccI</i>	5' – GTMKAC – 3'	T-M 間	GTMKA <sup>5m</sup> C	-
	3' – CAKMTG – 5'		GT <sup>5m</sup> CGAC	

(10)

制限酵素の 1 ユニット (U) は、1 時間で 1 μg の DNA を完全に消化できる酵素活性であると定義すると、本実験でプラスミド A を完全に消化するためには最低何 μl の制限酵素のが必要であったか、また本実験では最低何分の消化時間が必要であったかを計算過程も含めて記述せよ。

本実験では、プラスミド A を 0.75[μg] 用いた。1 ユニットは、酵素が一時間あたりに 1[μg] の基質を反応させることができる量である。10 ユニットでは一時間あたりに 10[μg] 反応させることができる。以上から、今回のプラスミド A を完全に分解するには

$$1[\mu\text{l}] \times \frac{0.75}{10}[\mu\text{g}] \times \frac{60}{50}[\text{min}] = 0.09[\mu\text{L}]$$

必要である。さらに、最低限必要な時間は

$$\frac{60[\text{min}]}{10[\mu\text{g}]} \times 0.75 = 4.5[\text{min}]$$

である。

参考文献

<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/restriction-enzymes.html> 制限酵素について学ぶ | Thermo Fisher Scientific - JP

[https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic\\_info.php?unitid=U100002660](https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100002660) 制限酵素活性に対するメチル化の影響 | タカラバイオ株式会社