

令和 5 年度 化学生命工学実験 3

遺伝子組み換え実験

学籍番号 : 082110424

氏名 : 中村優作

実施日 : 10/18, 19

1 目的

遺伝子組み換えの技術は疾病の遺伝子治療や動物のクローン作製などに応用され、大きな成果を挙げつつある。本実験では、遺伝子の*E. coli*への導入、連結酵素による DNA の結合、制限酵素による DNA 断片の切断を行い、得られた DNA 断片を電気泳動により分析することを目的とする。

2 操作

2.1 PCR

PCR 酵素 15 μ L が入ったマイクロチューブに超純水 3 μ L と template 6 μ L と primer 6 μ L を加えて調整した。調整した溶液を装置にセットし、以下の図 1 プログラムで PCR を行った。

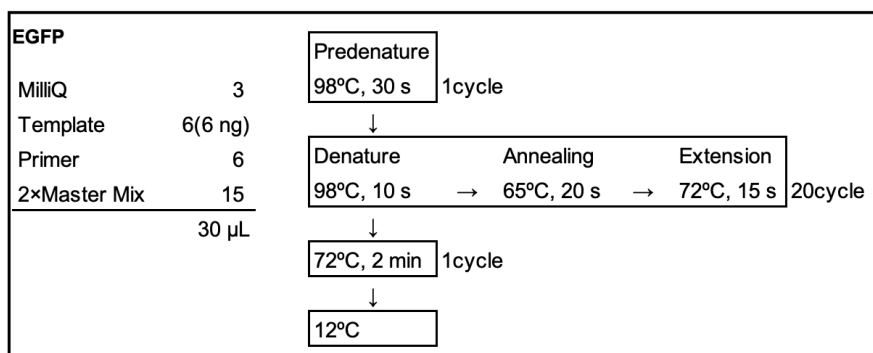


図 1: PCR プログラム

2.2 電気泳動

6x loading buffer 入りのエッペンチューブに PCR 後の溶液を 10 μ L 加えた。その後 100V で 20 分間電気泳動をした。その後、電気泳動で確認できたバンドを切り出してカラムで DNA を観察した。ゲル精製した EGFP と *GABA_{B1}* をコードする DNA 断片とベクターとなる pBlueScript を制限酵素で切断した。

2.3 ligation

エッペンチューブ 2 本に制限酵素処理をした pBluescript(vector) を 2.5 μ L ずつ加え、続いて片方に EGFP をコードする DNA 断片 (insert)、もう片方に *GABA_{B1}* をコードする DNA 断片 (insert) を 2.5 μ L 加えた。酵素と緩衝液である ligation mix を 5 μ L 加えて、16°C で 30 分反応させた。2 μ L の 6x loading buffer が入ったエッペンチューブに ligation 前のペリレン、EGFP, GABA を各 3 μ L ずつ加えた。また、1 μ L の 6x loading buffer が入ったエッペンチューブ 2 本にそれぞれペリレンと EGFP 4 μ L ずつ、ペリレンと GABA 4 μ L ずつ加えた。これらの溶液を 16°C で 30 分反応させた。その後、30 分間 100V で電気泳動をした。

2.4 transformation

2.3 で調整したペリレンと EGFP の溶液、ペリレンと GABA の溶液を $5\mu\text{L}$ とり、新しいチューブ内でコンピテントセル $30\mu\text{L}$ とそれぞれの溶液を混合した。タッピング後、氷上で 5 分間静置して、コンピテントセルを 42°C で 45 分間加熱した。その後 5 分間静置して LB プレートへ菌を撒いた。LB プレートに生えたコロニーを 1 個突き、液体培地 2mL に加えた。

2.5 ミニプレップ

エッペンチューブに菌体を移し、 4000rpm で 1 分間遠心した。上澄みを除去して、Solution1($50\mu\text{M}$ グルコース, 20mM Tris-HCl($\text{pH}8.0$), 10mM EDTA) を 100mL 加えてボルテックスを行った。次に、Solution2(0.2M NaOH, 1% SDS) を $200\mu\text{L}$ 加えて転倒攪拌した。Solution3(2M 酢酸, 3M 酢酸カリウム) を $150\mu\text{L}$ を加えて転倒攪拌した。この溶液を 5 分間 1200rpm で遠心した。その後、新しいチューブに上澄みを移し、イソプロパノールを $400\mu\text{L}$ 加えてボルテックスした。再び 5 分間 1200rpm で遠心した。溶液の上澄みを除去し、 70% エタノール 1mL を加えた。再び 5 分間 1200rpm で遠心した。上澄みを完全に除去し、 55°C で乾燥した。その後 MilliQ $30\mu\text{L}$ により DNA を溶解させた。

2.6 制限酵素処理による DNA 断片の確認

DNA 溶液 $4\mu\text{L}$ と milliQ $11\mu\text{L}$ 、 10x 制限酵素緩衝液 (rCutSmart) $2\mu\text{L}$ を制限酵素入りの溶液 $3\mu\text{L}$ に混ぜた。その後、 37°C 30 分。反応後、反応溶液 $5\mu\text{L}$ を $1\mu\text{L}$ の 6x loading buffer が入ったエッペンチューブに加えてアガロースゲル電気泳動を 100V で 30 分間行った。

3 原理

3.1 カラム精製

固相抽出技術を利用し、シリカまたはガラスファイバーのフィルターメンブレンに DNA を結合させ、精製/分離を行う方法である。遠心処理を行うことで、DNA のシリカへの結合、洗浄、溶出を行うことができる。[1]

3.2 制限酵素処理

制限酵素は、二本鎖 DNA の特定の塩基配列を認識して結合し、切断する酵素である。制限酵素は切断に必要な因子や切断の仕方によって I 型から III 型の 3 種類に分けられる。I 型, III 型は切断部位が一定でないのに対し、II 型は特定の部位 (通常 DNA 上の回転対称配列) を切断するため、遺伝子組み換え実験には II 型酵素が用いられる。[2]

3.3 Ligation

ライゲーションとは、DNA リガーゼを使って DNA 断片同士をつなぐ反応で、DNA 末端を 5' リン酸と 3' OH 基間で結合するものである。[3]

3.4 Loading buffer

Loading buffer は、電気泳動用核酸サンプルを調整する際に添加する試薬である。ローディングバッファーにはアプライの際にウェルの中に DNA サンプルが沈むよう比重を増やすためのグリセロールまたはフィコールと、電気泳動の進行を観察できる色素が含まれている。[4]

3.5 電気泳動

ゲル電気泳動は、拡散やタンパク質等の生体分子を高分子ハイドロゲル中において電気泳動し、分子サイズに移動した泳動度の違いを利用して分離、分析する方法である。電圧を有する分子は溶液中において、伝場中に置かれると一定方向に向かって動き出す。この時、不電化を有する分子は陽極側に、正電荷を有する分子は陰極側に泳動される。高分子ハイドロゲル中において、これらの分子が泳動された時、網目からの抵抗を受けることで分子はそのゲルサイズに依存してゲル中を泳動することが知られている。大きな分子ほど遅く、小さな分子ほど早く泳動される。これは高分子ゲルが作り上げる網目の間を分子が通り抜ける速度が分子サイズに依存しているためである。[5] この性質を利用して、DNA やタンパク質等の生体高分子を分離、分析することができる。

3.6 EtBr

EtBr(臭化エチジウム) は、DNA 塩基対に似た挿入剤であり、核酸蛍光タグとして使用することができる。EtBr は DNA と結合すると強い蛍光を発する。これは、塩基対の間に見られる疎水性環境のためである。この環境に移動し、溶媒から離れることにより、EtBr カチオンは水に関連する分子を放出させられる。水は強力な蛍光消光剤であるため、水分子を除去すると EtBr が蛍光を発するようになる。[6]

3.7 形質転換

形質転換 (transformation) は、外来性 DNA が宿主細胞に移入されるプロセスである。形質転換の方法には、ケミカルトランスフォーメーション、エレクトロポレーションなどがある。ケミカルトランスフォーメーションでは、塩化カルシウムのような 2 価の陽イオンで処理することにより、コンピテントセル (細胞が外来 DNA を取るこむことができる状態) にし、最近の細胞壁を DNA に対して透過性にする。熱ショックによって細胞膜に一時的に孔を形成し、外来 DNA の細胞内への移行を可能にする。エレクトロポレーションでは短い電気パルスを用いて最近細胞を一時的に投下性にする。この状態で外来 DNA を細胞に加えることで、細胞内に取り込まれる。[7]

3.8 アンピシリン (Amp)

アンピシリンはペニシリン系の抗生物質で、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。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。一方で、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。目的遺伝子をプラスミドベクターに組み込み形質転換を行うとき、ベクター DNA にβラクタマーゼ遺伝子が含まれていると、アンピシリン存在下で培養した場合、プラスミド DNA が導入されたバクテリアが生育でき、選り出すことができる。[8]

3.9 IPTG

IPTG(isopropyl β-D-thiogalactopyranoside) は、大腸菌 (E.coli) などのラクトース (lac) オペロン制御下にある遺伝子の発現を誘導する化合物である。IPTG は、lac リプレッサーに結合し不活性化することで lac オペロンの転写を誘導する機能を持ち、また発現するβ-ガラクトシダーゼ (lacZ) の基質とはならないため、持続的に機能する。[9]

3.10 ミニプレップ

ミニプレップは、プラスミド DNA を抽出するための手法である。Solution1 に含まれるリゾチームは、細胞壁の分解、グルコースは、浸透圧を与えて細胞膜を破壊する役目、EDTA は金属イオンを活性中心に持つデオキシリボヌクレアーゼを阻害する目的がある。この操作は細胞壁を溶解する操作である。Solution2 は、界面活性剤と pH により、細胞成分を完全に溶解するのがこの操作である。SDS は細胞の膜構造を破壊し、水酸化ナトリウムの高い pH により染色体 DNA を変性させる。Solution3 は pH を急激に中性に戻すことで、溶解したタンパク質と SDS, 染色体 DNA が複合体を形成し、不溶性の凝集物を形成する。[10]

3.11 アルコール沈殿

アルコール沈殿は、DNA を溶液から沈殿させる方法である。DNA は負に帯電したリン酸骨格を持ち、水溶液中で親水性コロイドとして存在している。エタノールなどの水溶性の有機溶媒を加えると水和水が奪われる。これに塩を加えるとリン酸基の負電荷間の反発が解消され、ファンデルワールス力が優勢となり、DNA 鎖どうしが凝集して沈殿する。磯プロパノールはエタノールより疎水性が高いため、核酸の溶解度が低く、より少ない量で拡散を沈殿させることができる。[11]

4 結果

4.1 PCR 後の電気泳動

PCR 後の電気泳動の結果を図 2 に示す。この段階ではバンドを確認することができなかった。

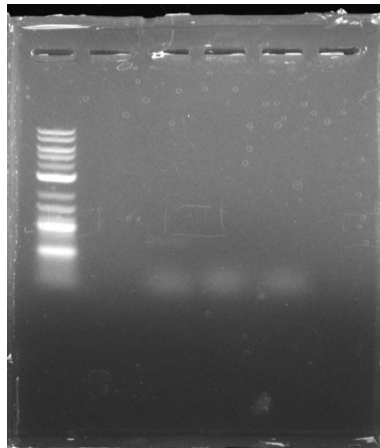


図 2: PCR 後の電気泳動 (左から 4 レーン目)

4.2 Ligation の電気泳動

Ligation 後の電気泳動の結果を図 3 に示した。

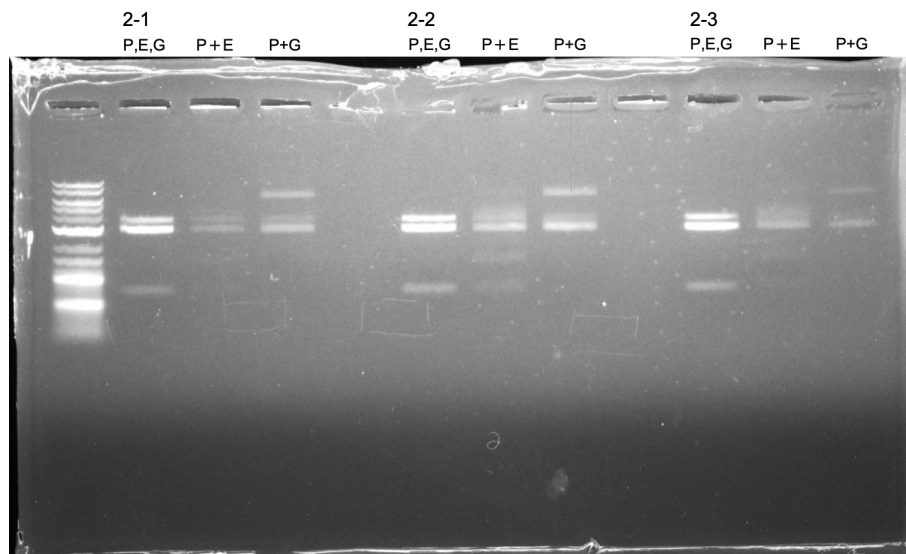


図 3: Ligation 後の電気泳動 (2-2)

4.3 Transformation

今回の実験では、Transformation 後の LB プレートにコロニーが発生しなかった。

4.4 制限酵素処理

制限酵素処理後の電気泳動の結果を図 4 に示す。

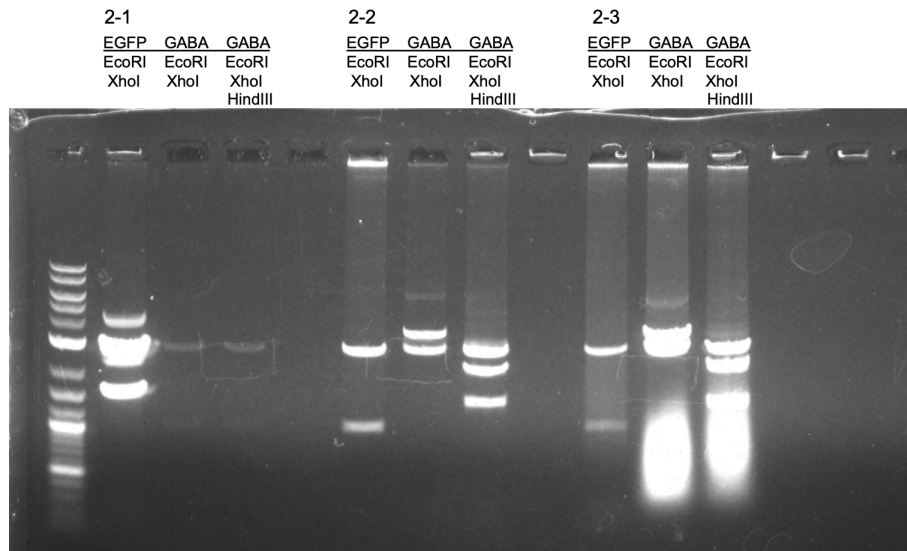


図 4: 制限処理後の電気泳動 (2-2)

5 設問/課題

5.1 PCR 法で遺伝子増幅を行う際、増幅反応が理想的に進行した場合、8 回のサイクル反応で、目的遺伝子は何倍に増幅されるか。

1 サイクルで 2 倍に増幅されるため、 $2^8 = 256$ 倍に増幅される。これは副生成物を含めた全ての DNA を表している。副生成物は n 回のサイクルで $2n$ ずつ増幅されるため、目的遺伝子は $2^8 - 2 \times 8 = 240$ 倍となる。

5.2 PCR 法における反応の理想条件について論ぜよ。

PCR に影響を与える因子には以下のものがある。[12]

1. 酵素濃度

Tag DNA ポリメラーゼは、通常 $1 \sim 2.5 \text{ units}/\mu\text{L}$ 反応液で使用される。一般に濃度が高すぎると非特異的産物が出現することがあり、逆に濃度が低すぎると増幅が不十分になる。

2. dNTP 濃度

通常それぞれ $20 \sim 200 \mu\text{mol/l}$ である。各 dNTP の濃度は同一でないと誤った取り込みによるエラーが生じる原因になる。

3. Mg^{2+} 濃度

通常、総 dNTP 濃度より $0.5 \sim 2.5 \text{ mmol/l}$ 高い濃度が採用される。鋳型 DNA やプライマーから持ち込まれる EDTA などのキレート剤の濃度に注意する必要がある。

4. プライマー

プライマーは通常 $18 \sim 28$ スクレオチド長で、G+C 含量が $50 \sim 60\%$ で、 T_m 値が $55 \sim 80^\circ\text{C}$ となるように設計する。2 つのプライマーはそれぞれ $0.1 \sim 0.5 \mu\text{mol/l}$ で使用する。

5. 温度

変性温度は高いほど特異性や増幅度が高くなるが、逆に TagDNA ポリメラーゼの活性低下を早めるので、普通は 94~96°C で 15~30 秒間である。プライマーのアニーリング温度は、T_m 値より 5°C 程低い温度が良く、通常 50~60°C である。アニーリング温度が高いほど特異性は高くなる。伸長反応の温度は、72°C が多く用いられる。

6. サイクル数

サイクル数は多いほど増幅度は高くなるが、同時に非特異的産物も増加する。通常は 40 サイクルを超えないことが望ましい。

5.3 Ligation 溶液 (P+E または P+G) を加えて形質転換させた大腸菌を播いた LB プレート上の青と白のコロニーの比率を比較し、違いがある場合にはその原因を考察せよ。

本実験では、コロニーが発生しなかったため、他の班のデータを使用する。LB プレートに生えたコロニーを図 5, 6 に示す。

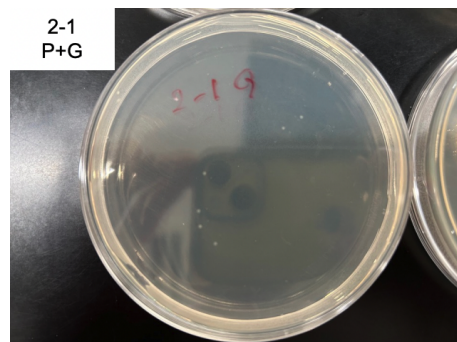
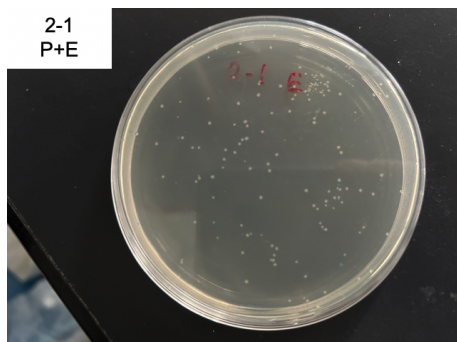


図 5: LB プレート (ペリレンと EGFP) の結果 (2-2) 図 6: LB プレート (ペリレンと GABA) の結果 (2-2)

それぞれのコロニーの数を数えた結果を表 1, 2 に示す。

表 1: LB プレート (ペリレンと EGFP) の結果 (2-2)

青	白	合計	青/白
2	135	137	0.015

表 2: LB プレート (ペリレンと GABA) の結果 (2-2)

青	白	合計	青/白
0	8	8	0

結果から、ペリレンと EGFP を用いた場合は青いコロニーが残存したが、ペリレンと GABA を用いた場合は、青いコロニーが残存しなかった。これは、ペリレンと EGFP を用いた場合は、完全にはすべてのプラスミドに外来 DNA が挿入されていなかったため、青いコロニーが残存したと考えられる。一方で、ペリレンと

GABA を用いた場合は、完全にはすべてのプラスミドに外来 DNA が挿入されていたため、青いコロニーが残存しなかったと考えられる。

5.4 青いコロニーと白いコロニーが生成するのはなぜか？

β -D-ガラクトシダーゼの基質である青色色素 X-gal を寒天培地に加えておくと、 β -D-ガラクトシダーゼの作用により分解されてコロニーは青色になる。一方で、この酵素活性を欠くコロニーは白色になる。このようにして、外来 DNA がプラスミドに挿入されたかどうかを判断することができる。[13]

5.5 電気泳動による DNA の確認の際に、白いコロニーを液体培養したにもかかわらず制限酵素反応から想定されるバンドが検出できないことがある。その原因を推測せよ。

制限酵素の中には、DNA に強く結合しているものも存在する。そのため、想定されるバンドより大きいものまたはスメアが検出されることが考えられる。この場合、SDS を含むローディング色素を使用し、切断された DNA から酵素を加熱して分離することによって誤ったゲルシフトを防ぐことができる。[14]

5.6 制限酵素反応後の電気泳動で確認されたバンドが示す DNA のサイズを決定せよ。

図 4 から、検量線を作成し、観測されたバンドから確認された DNA 断片の大きさを求めた。検量線を図 7、各バンドの泳動距離を図 3 に、DNA 断片を求めた結果を表 4 に示す。

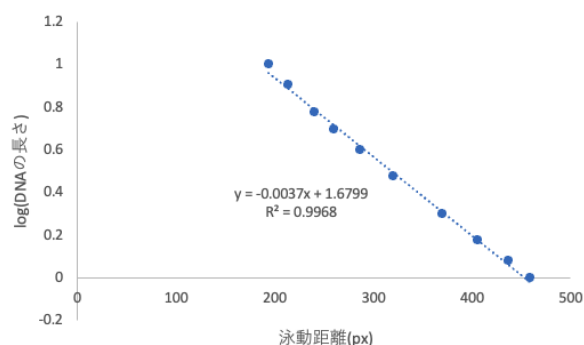


図 7: 制限処理後の電気泳動の検量線

表 3: 制限酵素反応後の電気泳動で確認されたバンドの泳動距離 (px)

EGFP(EcoRI, Xho I)	GABA(EcoRI, Xho I)	GABA(EcoRI, Hind III)
328	297	327
452	324	360
		412

また、制限酵素処理で理論的に確認されるバンドについて図 8 に示す。

実測値と比較すると、EGFP でのサイズが小さいバンド以外での誤差が $\pm 5\%$ 以内であり、制限酵素処理によっておおむね正しく DNA 断片が得られたと考えられる。EGFP の DNA が小さい方のバンドで理論値

表 4: 制限酵素反応後の電気泳動で確認されたバンドが示す DNA のサイズ (bp)

EGFP(EcoRI, Xho I)	GABA(EcoRI, Xho I)	GABA(EcoRI, Hind III)
2926	3811	2951
1017	3028	2228
		1431

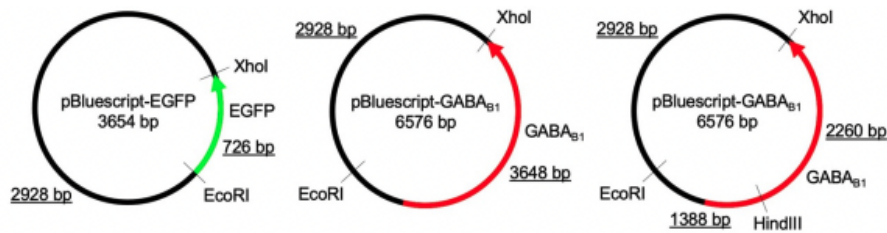


図 8: 制限酵素反応後の電気泳動で確認されるバンドの理論値

と実測値の誤差が大きい原因として、検量線の縦軸 (DNA の長さ) は対数をとった値を使用しており、DNA の長さが小さいほど、検量線から算出した値の定量的信頼性が低くなっていることが考えられる。また、ゲルに埃などのゴミが混入していたことも考えられる。

6 考察

6.1 Ligation 後の電気泳動

課題 5.6 と同様に、Ligation 後の電気泳動の結果から検量線を作成して、観測されたバンドから確認された DNA 断片の大きさを求めた。検量線を図 9、各バンドの泳動距離を図 5 に、DNA 断片を求めた結果を表 6 に示す。

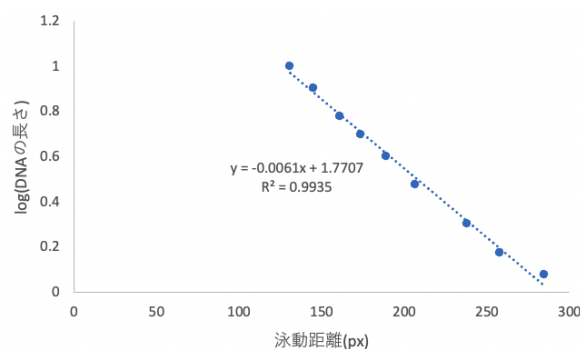


図 9: Ligation 後の電気泳動の検量線

また、pBlueScript, EGFP, GABA, pBlueScript + EGFP, pBlueScript + GABA の DNA 断片の大きさの理論値を表 7 に示す。

以上の理論値と実測値を比較すると、pBlueScript + EGFP, pBlueScript + GABA に対応する DNA が確

表 5: Ligation 後の電気泳動で確認されたバンドの泳動距離 (px)

P, E, G	P, E	P, G
196	199	151
300		200

表 6: Ligation 後の電気泳動で確認されたバンドが示す DNA のサイズ (bp)

P, E, G	P, E	P, G
3759	3604	7072
872		3554

表 7: Ligation 後の電気泳動で確認されたバンドが示す DNA のサイズ (bp)

pBlueScript	EGFP	GABA	pBlueScript + EGFP	pBlueScript + GABA
2961	726	3648	3687	6647

認できるため、Ligation が成功していると言える。

6.2 PCR 後の電気泳動

本実験では、EGFP の PCR 後の電気泳動で、バンドを確認することができなかった。また、考察 6.1 で Ligation 後のバンドの同定をした際に、pBlueScript + EGFP のバンドは確認できたことから、PCR 自体には成功しているがバンドは観測されなかったことが言える。Ligation 後の電気泳動で GABA に対応する大きさのバンドは観測されたが、EGFP は観測されなかったことから、PCR で使用した際に EGFP の希釈を過剰に行なってしまったことが原因と考えられる。

参考文献

- [1] ゲノム DNA 精製システム選択ガイド, ThermoFisher,
https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/dna_nap_bid_ts_1
- [2] 制限酵素, 東邦大学,
https://www.toho-u.ac.jp/sci/biomol/glossary/bio/restriction_enzyme.html
- [3] クローニングの基礎知識, ThermoFisher,
<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/cloning/traditional-cloning-basics.html>
- [4] Loading buffer, ニッポン・ジーン株式会社, <https://www.nippongene.com/siyaku/product/buffer/electrophoresis/loading-buffer.html>
- [5] ゲル電気泳動, 公益社団法人高分子学会,
https://www.spsj.or.jp/equipment/news/news_detail_36.html

- [6] Ethidium Bromide(EtBr), ベルトールドジャパン株式会社,
<https://www.berthold-jp.com/ethidium-bromide/>
- [7] What Is DNA Transformation, GenScript,
<https://www.genscript.com/what-is-dna-transformation.html>
- [8] 教育目的遺伝子組換え実験, 大藤道衛, https://web.tuat.ac.jp/~identshi/Japanese%20Files/Seminar_Folder/rikakyoin_Folder/H27_Folder/Archives%20H27/H27_kensyu345_1.pdf
- [9] 植物由来の IPTG, funakoshi, <https://www.funakoshi.co.jp/contents/51935>
- [10] いまさら聞けないプラスミド抽出法の原理, 高木 昌宏,
https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/8909/8909_yomoyama_1.pdf
- [11] エタノール沈殿あれこれ, 春木 満,
https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/8905/8905_yomoyama-1.pdf
- [12] PCR, ニッポン・ジーン株式会社,
https://www.nippongene.com/siyaku/product/pcr/cat_pcr.pdf
- [13] 大腸菌の菌株の特徴を知ろう, 林 勇樹,
https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9401/9401_yomoyama.pdf
- [14] 制限酵素の主な注意点, ThermoFisher,
<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/molecular-cloning/restriction-enzymes/restriction-enzyme-key-considerations.html>