

遺伝子組換え実験 (Genetic recombination)

背景と概要 (Backgrounds and abstracts)

DNAに関する知見の集約は70年代に遺伝子組換え技術の確立という形で結実し、生命現象における巧みな調節機構を解明するとともに、人為的な生物種の改変をも可能にした。以来遺伝子は多くの研究者が簡単に扱える生体材料として確固たる地位を占め、遺伝子組換え菌は、ホルモン、酵素などの生理活性物質の工業生産を効率化する上で重要な道具となっている(図1)。これらの技術は疾患の遺伝子治療や動物のクローニングなどに応用され、大きな成果を挙げつつある。本実験では、現在使用されている遺伝子操作技術を理解するために、制限酵素によるDNAの切断、連結酵素によるDNAの結合、さらには遺伝子の大腸菌への導入を行い、その一端に触れる。

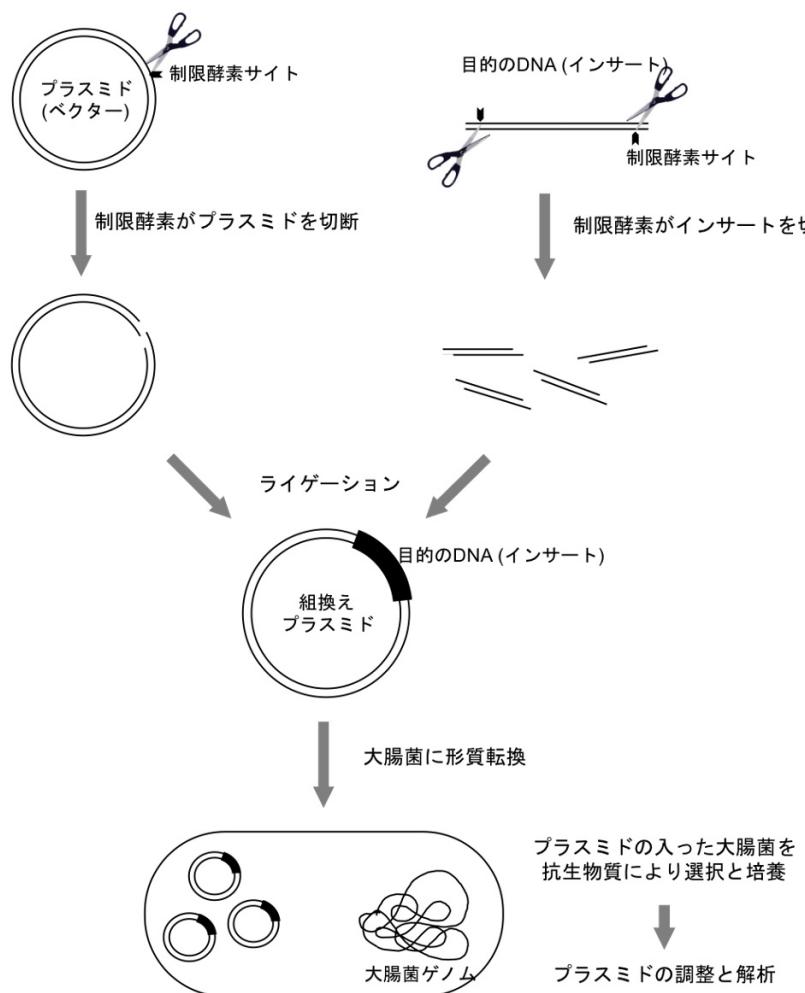
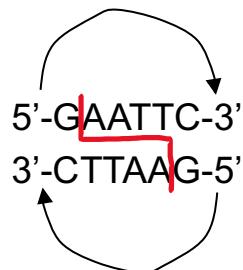


図1 大腸菌を用いたDNA組換えプラスミドの調製

Supporting Information

1) 制限酵素 (Restriction enzymes)

DNA を特定の配列の箇所で切斷する酵素を制限酵素という。この酵素は通常 DNA 上の回転対称配列 (パリンドローム、palindrome) を認識して切斷する (図 2)。遺伝子組換えの際に、はさみ (scissors) の役割を果たす。



180度回転しても同じ配列

図 2 パリンドローム (回転対称) 配列

2) アガロースゲル電気泳動 (Agarose gel electrophoresis)

DNA を分離、分析する際にはゲル電気泳動法が用いられる。ゲル電気泳動には使用する支持体により、アガロースゲル電気泳動とポリアクリルアミドゲル電気泳動がある。後者は低分子量の DNA の分離、分析に用いられる。ゲル電気泳動の方式にはディスクゲル法、スラブゲル法、サブマリン法などがある。ここではサブマリン型アガロースゲル電気泳動により切斷したプラスミドの DNA 断片の解析を行う。

【準備】

・泳動用緩衝液の作製

500 ml ビーカーに 20×TAE (Tris-acetate-EDTA) 緩衝液 25 ml を入れ、蒸留水 475 ml を加える。エチジウムプロマイド (EtBr) 溶液 20 μ l を加えて混合する。

・アガロースゲルの作製

200 ml の三角フラスコにアガロース 1 g をはかり取り、上で作製した泳動用緩衝液のうち 100 ml を加え、アガロースが完全に溶けるまで電子レンジで加熱する。

↓

ゲルトレイに均等な厚さになるように入れる。

↓

サンプルコームをセットする。

↓

1 時間程してゲルが固まったら、サンプルコームをゆっくり垂直に抜き取る。

【方法】

・アガロースゲル電気泳動

泳動槽に泳動用緩衝液 300 ml を入れる。

↓

試料穴（ウェル）のある側を陰極に向けてトレイを泳動槽にセットする。

↓

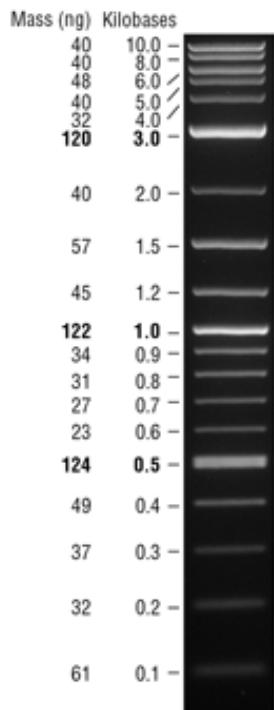
制限酵素反応溶液をすべてゲルのウェルに静かに流し込む。一番端のウェルにはサイズマーカーを 5 μ l 入れる。（どこに何を入れたかメモしておくこと）

100 V で 20~30 分間泳動する。

↓

電源を切り、手袋をしてトレイごとゲルを取り出す。トランスイルミネーター上にゲルを載せ、紫外線下で DNA のバンドを確認すると同時に、写真撮影する。（紫外線を直接目で見ないこと）

【結果の整理】



電気泳動で確認されたバンドの分子量を決定する。

（方法）

写真から定規を用いてサイズマーカーの各バンドの泳動距離を測定し、片対数グラフの縦軸に各バンドの DNA の長さを、横軸に泳動距離をプロットし、標準曲線を作成する。続いて試料のバンドについても泳動距離を測定し、作成した標準曲線から DNA 断片の大きさを求める。

図 3 DNA サイズマーカー (DNA size marker)

DNA 組換え実験 (Recombinant DNA experiments)

DNA 組み換え実験において DNA の切り貼りは基本的な操作の一つである。今回は PCR により増幅した DNA 断片 (EGFP 遺伝子と GABA_{B1} 遺伝子) を切り出し、別のプラスミド (pBluescript) に導入するという操作を行う。本実験で使用する pBluescript は DNA を組み込む部位にガラクトシダーゼの遺伝子 *lacZ* をコードしており、外来 DNA が挿入された場合には *lacZ* は破壊される。ガラクトシダーゼは X-gal と呼ばれる化学物質を分解して青色を示すが、組み換え DNA の大腸菌への形質転換の際、この物質をプレート上に塗っておけば組み換えたプラスミドに DNA が入っていると青色を示すことができず容易に選択できる (青白選択、blue-white screen)。

1) EGFP 遺伝子の増幅 (PCR)

【方法】

以下の溶液を PCR 用マイクロチューブに作製する。

2x Master Mix	15 μ l
EGFP 増幅用プライマー	各 3 μ l
鑄型 DNA (template DNA)	6 μ l (6 ng)
超純水	3 μ l
<hr/>	
Total	30 μ l

PCR 反応条件

98 °C 30 sec
↓
98 °C 10 sec
65 °C 20 sec
72 °C 15 sec 20 cycles

アガロースゲル電気泳動により目的 DNA のバンドを確認し、カッターナイフで目的のバンドを切り出す。

2) DNA 断片の精製 (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega)

PCR で増幅した EGFP 断片(742 bp)とあらかじめ準備された GABA_{B1} 断片(3665 bp) と pBluescript (2928 bp)の精製を行う。

【方法】

アガロースゲル 10 mg あたり、10 μ l の Binding Solution を加え、ゲルが完全に溶けるまで 55 °C で保温する。

↓

ミニカラムをコレクションチューブに入れる。

↓

溶かしたゲル溶液をミニカラムに移し、室温で 1 分間置く。

↓

16,000 \times g で 1 分間遠心し、ミニカラムを通り抜けた溶液を捨てる。

↓

700 μ l の Wash Solution を加え、16,000 \times g で 1 分間遠心し、ミニカラムを通りぬけた溶液を捨てる。

↓

再度、500 μ l の Wash Solution を加え、16,000 \times g で 5 分間遠心する。

↓

新しいマイクロチューブにミニカラムを移し、蒸留水 30 μ l を加えて 1 分間静置した後、16,000 \times g で 1 分間遠心し、DNA 溶液を回収し、濃度測定する。

3) EGFP 断片の制限酵素処理 (Digestion by restriction enzymes)

【方法】

以下の溶液をエッペンドルフチューブに作製する。

DNA 溶液	15 μ l
超純水	8 μ l
EcoRI-HF	2 μ l
Xhol	2 μ l
<u>rCutSmart</u>	3 μ l
Total	30 μ l

↓
37 °C で 15 分間または 30 分間インキュベーション
↓
アガロースゲル電気泳動により目的 DNA のバンドを確認し、バンドを切り
出して 2)の手順に従い目的 DNA を抽出し、DNA 濃度を測定する。

4) DNA の連結反応 (ライゲーション、Ligation)

【方法】

回収した pBluescript と DNA 断片を連結する。pBluescript 9 μ l と DNA 断片 9 μ l を新しいマイクロチューブに入れて混ぜる。Ligation においてはベクターとなる DNA 断片とインサートとなる DNA 断片のモル比は 1:2~1:3 が理想的である。混合した溶液から 9 μ l を別のチューブに移し、保存する (コントロール用)。溶液の残り 9 μ l に DNA 連結用緩衝液を 10 μ l 加え、そこに DNA 連結用酵素 DNA リガーゼを 1 μ l 加えて、室温で 30 分反応させる。反応後、半量 (10 μ l) 取り、コントロールの溶液と隣り合わせて電気泳動し、連結反応が進んでいることを確認する。

5) 連結したプラスミドの大腸菌への導入 (形質転換、Transformation)

通常組み換え実験は連結したプラスミドを選択して単離するのに大腸菌への導入を行う。これは形質転換と呼ばれる方法でありプラスミドが導入された大腸菌は抗生物質耐性によって選択される (本実験ではペニシリン系のアンピシリン)。また前述したように、組み換えられたプラスミドを導入された大腸菌は青白選択によって選択できる。今回は連結したプラスミドを各班で大腸菌に形質転換し、白色コロニーの比率を調べる。

【準備】

- LB 培地と LB プレートの作製

LB 培地の組成 (200 ml 三角フラスコ)

ポリペプトン	1 g/100 ml
Yeast Extract	0.5 g/100 ml
NaCl	1 g/100 ml

pH を 7.2 にあわせた後でオートクレーブする。

LB プレートの組成 (200 ml 三角フラスコ)

ポリペプトン	1 g/100 ml
Yeast Extract	0.5 g/100 ml
NaCl	1 g/100 ml
Agar	2 g/100 ml

pH を 7.2 にあわせた後でオートクレーブする。

オートクレーブ後、15 分程冷ましたのちアンピシリン溶液 (100 mg/ml) を 100 μ l 入れ、プラスチックシャーレに注ぎ込み、固まるのを待つ (約 30 分)。

【方法】

各班で反応した 2 種類の DNA 連結溶液 10 μ l を形質転換用大腸菌 (コンピコンピセル) 100 μ l に混ぜて、氷中で 30 分間放置する。

↓

42 °C で 45 秒間処理

↓

800 μ l の LB 培地を入れて 37 °C で 1 時間保温

↓

5000 rpm で 5 分間遠心し、菌体を集め。上清をピペットで取り除き、100 μ l の LB 培地で懸濁する。

↓

懸濁した菌体溶液をアンピシリンと X-gal, IPTG (イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド) の入った LB プレートにプレーティングする (DNA 溶液が 2 種類なので 2 枚になっているはずである)。

↓

37 °C で一晩培養する。

↓

青コロニー、白コロニーの数を数え白コロニーの比率を出す。

5) 大腸菌からのプラスミド DNA (Miniprep)

【試薬】

Solution 1: 50 mM glucose, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA

Solution 2: 0.2 M NaOH, 1% SDS

Solution 3: 2 M acetic acid, 3 M potassium acetate

【方法】

白いコロニーを爪楊枝でつつき、2 ml のアンピシリン入り LB 培地が入った試験管に植菌する (一人 1 コロニー)。

↓

37 °C で一晩しんとう培養する。

↓

十分に増えた大腸菌をマイクロチューブに 1 ml 取り、10000 rpm で 1 分間遠心する。

↓

上清を除き、菌体にトリス-グルコース溶液 (solution 1) 100 µl を入れボルテックスでよく混ぜる。

↓

アルカリ-SDS 溶液 (solution 2) 200 µl を入れ、優しく手で攪拌し、氷上で 5 分放置する。

↓

酢酸-酢酸カリウム溶液 (solution 3) 150 µl を入れ、ボルテックスでよく混ぜて、氷上で 5 分放置する。

↓

12000 rpm, 4 °C で 10 分間遠心し、上清をマイクロチューブに回収する。

↓

350 µl のイソプロパノールを加え、ボルテックスでよく混ぜる。

↓

12000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心し、上清を除き、70%エタノールを 1 ml 加える。

↓

12000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心し、上清を除く。ふたを開けて 55 °C に置き、

エタノールをとばす。

↓

最後に蒸留水 30 μ l に溶かし、RNase 溶液を 1 μ l 入れる (DNA 調製終わり)。

6) 制限酵素処理による DNA の確認 (Restriction site analysis)

DNA 溶液 15 μ l と 10x の制限酵素緩衝液 (rCutSmart) 2 μ l を新しいマイクロチューブに入れる。制限酵素を含む液を 1 μ l ずつ加えて混合し、37 °C で 30 分反応させる。

EGFP を組み込んだプラスミド DNA

(1) EcoRI-HF、Xhol

GABA_{B1} を組み込んだプラスミド DNA

(1) EcoRI-HF、Xhol

(2) EcoRI-HF、Xhol、HindIII-HF

制限酵素処理後にアガロースゲル電気泳動を実施して (100 V、20~30 分間) バンドパターンを観察し、得られたプラスミド DNA が目的物かどうか判断する。

【結果の整理】

- 1) 2 種類 (EGFP、GABA_{B1}) の DNA 連結溶液のそれぞれの白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。
- 2) 青いコロニー、白いコロニーの両方がみられるのはなぜか。
- 3) DNA の最終チェックで白いコロニーにもかかわらず、バンドが検出できないこともある。その原因を推測せよ。