

# パン酵母を利用した 組換えDNA実験キット



先生用マニュアル

山口大学工学部

## キット内容（10グループ用＋予備実験1回分付）

先生用マニュアル	1冊	
生徒用マニュアル	1冊	
酵母菌予備実験用（0.3 ml）	1本	冷凍庫（-20℃）保存
酵母菌本番用（1.5 ml）	1本	冷凍庫（-20℃）保存
アミラーゼ遺伝子導入済酵母菌*	1本	冷凍庫（-20℃）保存
DNA液（各 0.05 ml）	12本	冷凍庫（-20℃）保存
遺伝子導入液（各 0.2 ml）	12本	冷凍庫（-20℃）保存
YPD培地**	6枚	冷蔵庫（4℃）保存
デンブンプ培地**	11枚	冷蔵庫（4℃）保存
最少培地**	12枚	冷蔵庫（4℃）保存
発色液**（3 ml）	11本	冷蔵庫（4℃）保存
スプレッター**	12本	1本每包装
ループ**	34本	1本每包装
滅菌済スポイト**	23本	1本每包装
スポイト（発色液用）	11本	個別包装なし
フロート	1枚	

\*遺伝子導入済酵母菌は必要ならば使用してください。遺伝子導入が成功した場合には使用する必要はありません。

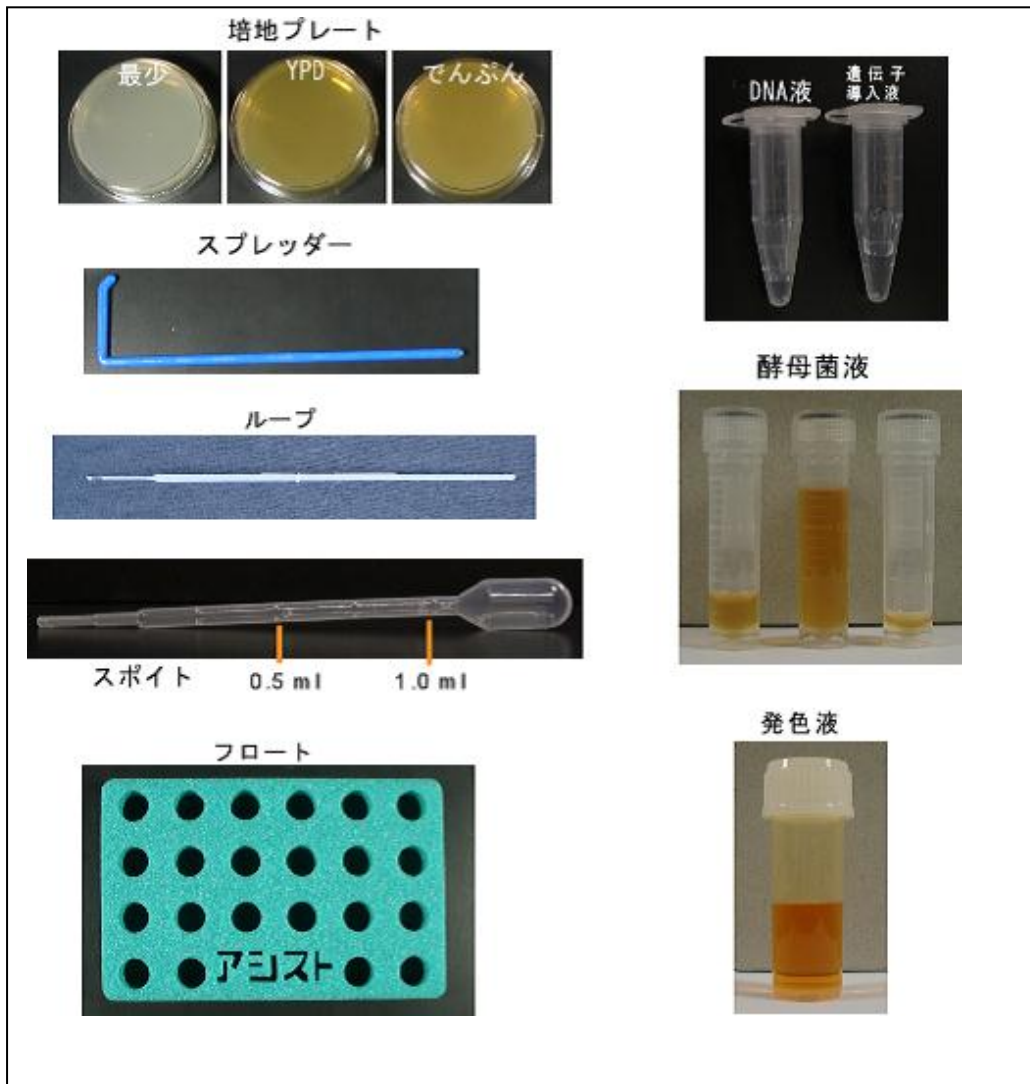
\*\*予備実験用も含む。

組成は付録参照

## キットの保存

- ・マイクロチューブに入っている酵母菌，DNA液，遺伝子導入液はまとめて冷凍庫に入れて保存してください。
- ・プレート培地類も冷蔵庫においた方が長持ちしますが，室温で保存しても構いません。
- ・多くの器具は殺菌しています。袋を開けた場合でも保存するときには袋をとじてください。

# キットに含まれているもの



## 先生に用意していただくもの

・湯浴 (42℃)	1 個	なべ等に湯を入れて 42℃にする。
・温度計	1 本	42℃設定のため。
・殺菌槽	1 つ	容器に漂白剤 (キッチンハイター等) を入れる。
・はさみ	グループ数	袋から器具をだすため。
・ごみ袋	グループ数	小さめでよい。写真のようにおくと便利。
・サインペン	グループ数	チューブやプレートに記入するため。

## 酵母組換えDNA実験キット

平成14年に改訂された文部科学省の「組換えDNA実験指針」では教育目的組換えDNA実験指針が新設され、さらに、平成16年の組換えDNA実験の法令化では教育目的組換えDNA実験の枠組みはなくなりましたが、基本的に平成14年の実験指針に従って行うこととされています。このキットは国の規則に合わせて、組換えDNA、遺伝子、タンパク質、酵素などを学ぶことができるキットです。本キットは、高等学校等で教材としての使いやすさを特に配慮しています。

このキットには、以下のような特徴があります。

- 1) 安価である。
- 2) 教師の準備の手間がほとんどない。
- 3) 特別な実験機器を全く必要としない。
- 4) すべての試薬、器具が含まれている。
- 5) 簡単で失敗がない。
- 6) 教師用予備実験も含まれている。
- 7) 保存できる。
- 8) 身近なパン酵母やアマラーゼを利用するので安全で親しみやすい。
- 9) 生物 I と II の教科書との対応が考えられている。
- 10) 工夫が盛り込め、高度な実験への展開も可能である。

シンプルな実験操作で遺伝子導入や遺伝子からヒトに有用なタンパク質が生産される様子を学ぶことができます。実験を通して生物に対する理解が深まり、遺伝子への興味や人類社会におけるバイオテクノロジーの役割を考えるきっかけとなれば幸いです。

## 本キットの実験概要

アミラーゼはデンプンを分解する酵素で、だ液の中に入っています。実験ではカビアミラーゼ遺伝子を持つDNAを酵母菌に導入します。カビアミラーゼ遺伝子は、お酒の発酵に用いるこうじ菌 (*Aspergillus oryzae*) 由来のもので、酵素は消化薬にも利用されています。酵母菌はアミラーゼ遺伝子を本来持ちません。アミラーゼ遺伝子が導入された酵母は遺伝子が転写、翻訳されてアミラーゼが合成され、分泌されます。このアミラーゼ活性はデンプン分解能力で検出します。ヨウ素デンプン反応を使って培地に含まれるでんぷんの分解を調べます。

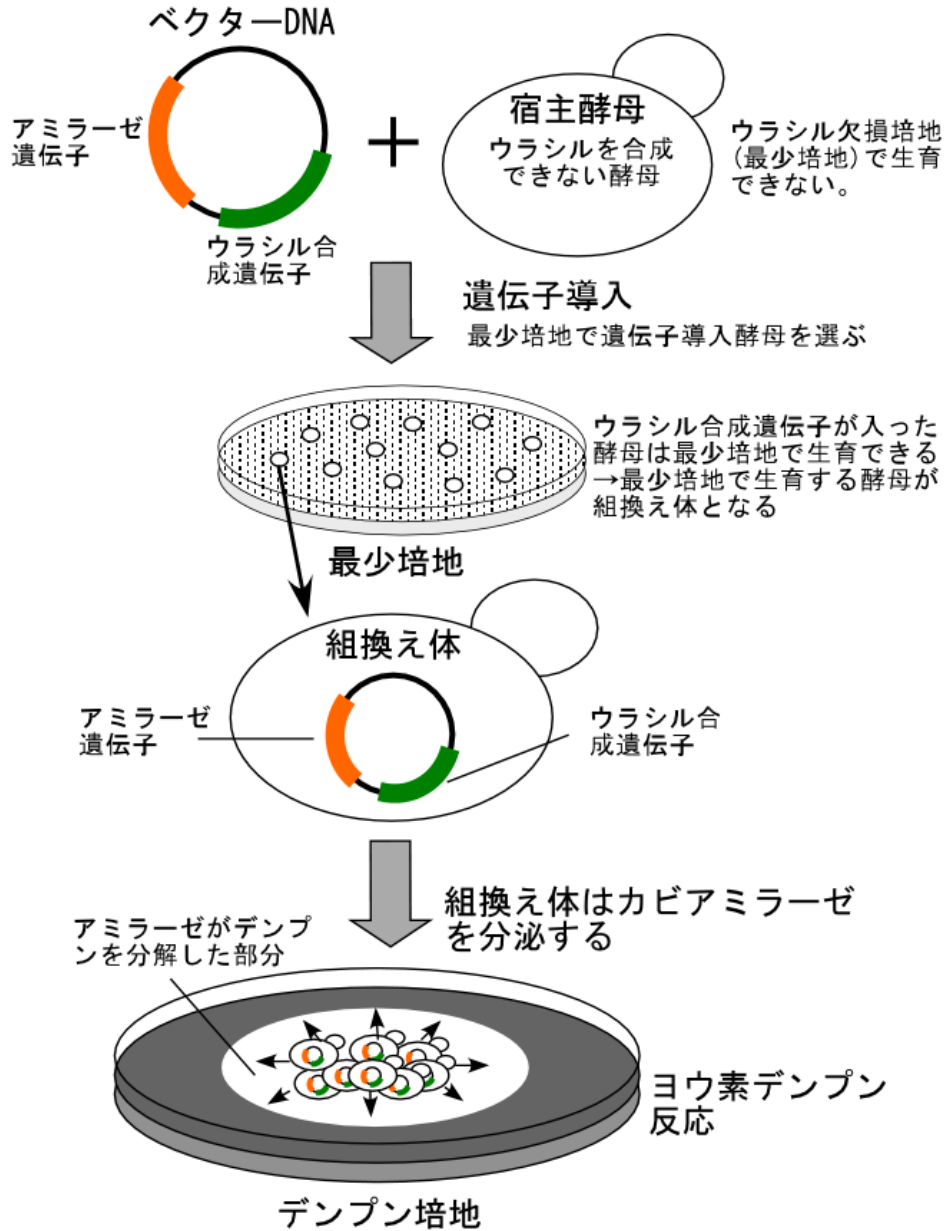
遺伝子導入のしくみは次ページの図のようになります。ウラシル (栄養素の一つ) を合成できない酵母菌を使います。この酵母はウラシルがない培地では生育できません。

この酵母にウラシルを合成する遺伝子が導入されたら、ウラシルがない培地でも生育できます。したがって、ウラシルを合成できない酵母菌とウラシル合成遺伝子をもつDNAを混ぜて、条件を設定するとDNAが酵母菌のいくつかに入ります。

中には遺伝子の入っていない酵母菌も多くいます。これらをすべてウラシルがない培地にまいてやれば、DNAが入った酵母のみが生育します。生育した酵母＝ウラシル合成遺伝子が入った酵母となります。ウラシル合成遺伝子の横にアミラーゼ遺伝子を隣接させているので、この酵母はアミラーゼ遺伝子も導入されることになります。

実験は驚くほど簡単です。一方、実験に含まれる知識内容には大変深いものがあります。このキットは簡単な体験学習としても構成できますし、大学レベルの内容を教えることもできます。

# 組換えDNA実験のながれ



# 教育目的組換えDNA実験とは

## 実験材料

教育目的組換えDNA実験では、安全性の高い実験材料が規定されています。遺伝子を導入する宿主は、大腸菌、枯草菌、培養細胞、酵母などで、導入する遺伝子は、アミラーゼ、セルラーゼ、ガラクトシダーゼ、グルコシダーゼ、ホスファターゼ、GFP、ルシフェラーゼとされています。本キットは、酵母菌を宿主とし、カビアミラーゼ遺伝子を用います。

酵母菌はパンやお酒などの食品に利用される最も安全な微生物の一つです。さらに、大腸菌に比べ操作が簡単で、教育目的の実験に最適な微生物です。

## 指導者の要件

教育目的の実験を行う場合には指導するものの要件が決められています。組換えDNAの取扱いを理解しており、大学在学中に組換えDNA実験の経験があるか、または、大学等が開催するセミナーに参加したことがある経験が必要です。

## 指導者の義務

実験を行う場合には、実験中の適切な指導、全体の管理監督および学校長の同意を得ることが必要です。また、実験者の名簿、実験場所、日時、使用材料などの記録と保存が必要とされています。

## 実験室と実験上の注意

実験室は、初等中等教育機関の理科室であれば問題なく、特別な設備は必要ありません。本キットでは、特殊な装置や器具は必要ありません。

実験上の注意事項としては、以下のようになります。

- ・窓や扉は閉じておく
- ・飲食、食品の保存、喫煙の禁止
- ・実験終了後に手を洗う
- ・口を使うピペット操作はしない
- ・保管管理を確実に
- ・実験終了後に組換え体、実験器具を確実に滅菌
- ・実験室の整理整頓

## 高校生物との関連

### 細胞の構造

単細胞生物である酵母菌を顕微鏡観察すれば微生物の細胞について考えることができます。

### 細胞の増殖

真核生物である酵母は顕微鏡観察も可能で出芽を観察することで細胞分裂や細胞周期も学ぶことができます。培地に生育するコロニーや培養後の酵母菌数を数えることで細胞の増殖期についても考えることができます。

### 遺伝子の本体DNA、転写と翻訳、遺伝暗号の解読、一遺伝子一酵素説、代謝と遺伝子の働き、遺伝子の働きと形質発現、バイオテクノロジー、遺伝子組換えなど

遺伝子は DNA でできています。DNA を観察するには魚の精子（白子）を利用した実験（参考実験）で観察することができます。また、遺伝子の本体が DNA であることを示すきっかけとなったグリフィスの形質転換実験と酵母菌の遺伝子導入も同じ意味の形質転換です。このキットの実験では DNA に 2 つの遺伝子を持たせているので 2 種類の形質が転換します。一つはウラシル合成遺伝子で、もう一つがアミラーゼ遺伝子です。

栄養（ウラシル）がないと生育できない酵母菌にウラシルを合成する遺伝子が入ればその栄養のない培地でも生育します。ウラシルは RNA の塩基の一つです。このしくみは一遺伝子一酵素説では栄養欠損変異が登場しますが、ウラシル欠損株も同じ内容で説明できます。また、正常なウラシル合成遺伝子を導入すれば、その遺伝子が入った酵母のみが増殖する実験系ができます。ウラシル合成遺伝子などをマーカー遺伝子と呼び、遺伝子導入には欠かせないものです。遺伝子組換え植物などでもほとんどの場合マーカー遺伝子を利用して遺伝子導入体を選択する方法を使っています。

### タンパク質と酵素、生体内の化学反応、消化など

アミラーゼはデンプン分解酵素です。単糖であるグルコースがつながって多糖になっているのが米やパンに含まれているデンプンです。デンプンはアミラーゼで分解され、グルコースになります。デンプンはヨウ素により紫色に染まります。しかし、分解されたグルコースはヨウ素では染まりません。これを利用して、酵素の活性を鋭敏に簡単に測ることができます。

アミラーゼはだ液にも含まれていますし、消化薬にも入っています。このキットのアミラーゼ遺伝子の産物は三共胃腸薬の中に入っているタカジアスターゼと同じものです。だ液中のアミラーゼの活性も簡単に調べることができる**アミラーゼ活性測定キット**も用意しています。本キットとアミラーゼ活性測定キットとを同時に利用されると遺伝子工学と酵素やタンパク質の知識が格段に増えるはずですが、また、これらのキットで遺伝子操作を行っているアミラーゼと自分のアミラーゼや医薬品のアミラーゼに触れることができますので、遺伝子と医薬や体のアミラーゼとの関連が身近な問題として捉えることができます。



## 先生の予備実験編（1週間程度）

実際の生徒への実験の前に、先生の方でキットを試験し、成功を確認するための予備実験を紹介します。予備実験では結果までの時間短縮のため最低限の時間で行います。また、得た結果やプレート等は保存し、生徒の実験が失敗したときにも成功例として示すことができます。DNAを入れない場合のコントロール実験は先生用の予備実験にしか入れていません。コントロール実験の用意としても予備実験を是非行ってください。恒温培養器等がなくても問題なく実験ができますが、培養器があれば時間が短縮できます。安価な恒温装置は3万円程度で手に入ります(SANSHO SIB-25 など)。

### 注意事項

空気中に浮遊している微生物や手に付着している微生物が混入しないように注意する無菌操作となります。可能であればガスバーナーの横やクリーンベンチで操作を行う方がよいですが、以下の点に注意すればほとんど問題は起こりません。

- ・ 培地プレートのフタをむやみに開けないこと。空気中の雑菌が混入する(写真)。
- ・ スポイト、ループ、スプレッダーを袋からむやみに出さないこと。操作の直前に出し、出したら手や服、実験台などに先がさわらないように注意すること。また、一度出したらテーブルの上に置くこともできない。もし置く必要がある場合は先があたらないように置く。
- ・ 酵母菌チューブは使用直前まで開けないこと。
- ・ イメージトレーニングを実際の操作の前に行っておくとよい。無菌操作なのでいったんスポイトやスプレッダーを袋から出すと中止できない。



### 実験後の片付け

#### 1. プラスチック器具

微生物はキッチンブリーチなどの塩素系除菌・漂白剤によって殺菌処理して捨てる。10 ml 程度のブリーチを1 Lの水に入れ、その容器に使用後のループ、スプレッダー、マイクロチューブ、スポイト類を入れる。10分以上置いたのち、プラスチックごみとして捨てる。

#### 2. プレート培地

プレート培地は、寒天培地をへらでプレートから取り出し、水の入ったなべに入れ、沸騰させて殺菌する。沸騰すれば、火を止め、水分は流しに、寒天などの固形物は生ごみとして捨てる。溶けた寒天を流しに流すときは水で寒天液を薄めながら流す必要がある。溶けた寒天が流しのパイプで固まると流しが詰まる原因となるので大量の水で薄める。

# 予備実験

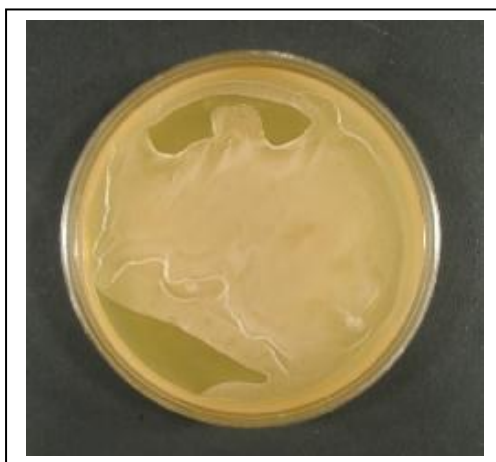
予備実験は生徒用実験とは違うセットになっています。予備実験セットを用いて実験を始めてください。

## 1 日目: 酵母菌の前培養を行う。(10分)

用意するもの

酵母菌チューブ (-20℃保存)	1 本
YPD培地	1 枚

1. 凍結した予備実験用酵母菌液 (0.3 ml) を溶かす。
2. 溶かした酵母菌のフタを開け、チューブから直接1枚のYPD培地にたらず。たらしたらすぐにフタをする。
3. たらした酵母液をシャーレを傾けながらシャーレ全体に広げる(写真)。
4. すぐにフタをして、室温で1日置く。30℃に保温できると増殖は最もよい状態になる。2日置いてよい。



参考：酵母菌は冷凍状態で1年以上保存できる。解凍を繰り返しても数回は使える。

## 2 日目: 酵母菌への遺伝子導入(コントロール実験も含む, 1時間)

用意するもの

前日準備した酵母菌培養プレート	1 枚 (写真)
DNA液	1 本 (室温で溶かす)
遺伝子導入液	2 本 (室温で溶かす)
ループ	2 本
最少培地	2 枚
スポイト	4 本
スプレッター	2 本
フロート	1 枚
42℃の湯浴	写真

1. 遺伝子導入液を冷凍庫から取り出し、解凍する。解凍した状態で数時間置いても問題ない。
2. 遺伝子導入液のチューブの1本のフタに「DNA」、もう1本にDNAを入れないコントロール「C」をサインペンで記入する。



3. 前日用意したYPDプレート上に生育している酵母菌をループ（丸のある側）でできるだけ多く集める。培地をかきとらないようにする。（写真）

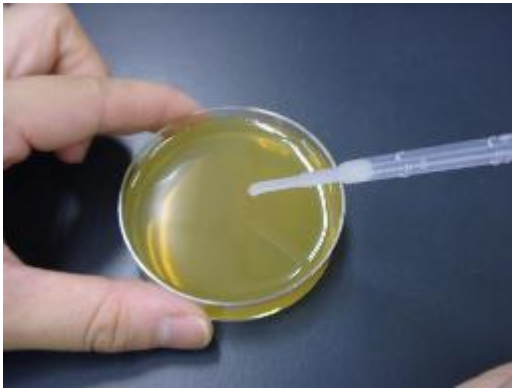


4. ループの酵母菌全部を遺伝子導入液に直接入れる。米粒程度は必要。それぞれのチューブにループを変えて2本ともに入れる（写真）。

**注意：**酵母菌の生育したYPD培地は冷蔵庫保存しておく。数日ならば導入効率は落ちるがそのまま使える。また、この酵母はアミラーゼ活性検出用のコントロール酵母としても使用するので廃棄しない。



5. 滅菌済スポイトを袋から取り出し、「DNA液」の中に入っているDNA溶液すべてを酵母菌の入った遺伝子導入液「DNA」に入れる。
6. 入れた後、同じスポイトで液を吸ったり出したりを5回繰り返すことで酵母菌を懸濁（けんたく）する（均一に酵母菌を遺伝子導入液に混ぜる）。この操作は重要。
7. コントロール「C」にはDNA溶液を入れなくて新しいスポイトで混ぜる操作を全く同じように行う。以後はDNA入りと同じ操作。
8. フロートにチューブを差し込み42℃（42℃以上の温度では酵母が弱るので注意）に20分置く。（湯浴は冷めていくと効率がある程度落ちるが問題ではない。途中で熱して42℃を維持する場合でも決してそれ以上の温度にならないように。この42℃の時間をのばせば遺伝子導入効率が上昇する。通常1～2時間がよい。授業時間の都合で変更可能であるが、20分は必要。）
9. 新しいスポイトを袋から出し、42℃に置いていた酵母-DNA混合液を「DNA」と記入した最少培地プレート（写真）の中心にたらず（写真）。たらずたらすぐにフタをしめる。

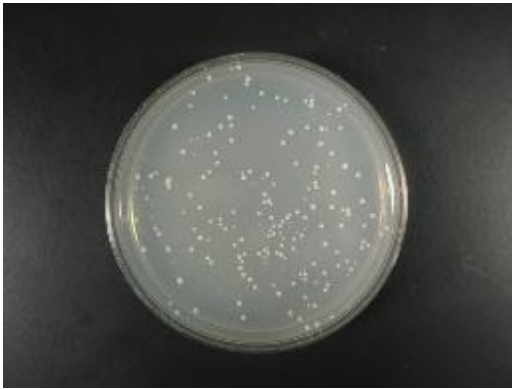


10. 「スプレッダー」で酵母 DNA 混合液をプレート上に均一に引き伸ばす。水分が残っているうちに引き伸ばしをやめる。乾いた後にスプレッダーで引き伸ばすと菌を取り除くことになるのでやりすぎは禁物。引き伸ばすとすぐにフタをする。



11. コントロールも同じようにプレートにまく。

12. 室温で3~7日、白いコロニーが現れるまで置いておく（写真）。もし、28℃~30℃の恒温インキュベーターがあれば、約2日で現れます。もし空気中などから混入した酵母菌以外のカビなどの微生物が発生したら早めに冷蔵庫に入れる。カビが混入するとプレートがカビで覆われてしまう。



参考：42℃の時間と効率（効率はコロニー数で現される）の関係を調べることで発展的な実験も可能。また、42℃ではなく室温に静置していても遺伝子導入が可能である。その場合は1日（約24時間）で高い遺伝子導入率が得られる。高校の実験時間を考慮して、このマニュアルでは20分を設定しているが、室温で1日置き翌日次の操作に移ってもよい。また、42℃は2時間程度が最も高い効率を示す。42℃がなぜ遺伝子導入効率を上げるのかはまだわかっていない。

#### 4日め：遺伝子導入酵母プレート観察とアミラーゼ活性検出の準備

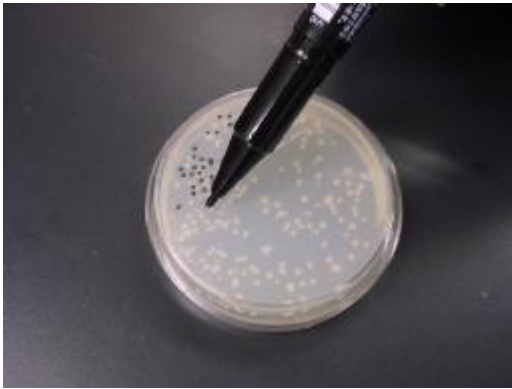
用意するもの

遺伝子導入酵母が生えた最少培地	1枚
導入前酵母菌	1枚
デンプン培地	1枚
ループ	3本
サインペン	1本

##### ・観察

「DNA」の最少培地に白い小さなもり上がった丸い点があくつも現れているはず。個々の点をコロニーと呼ぶ。冬場では気温が低いと酵母菌の成長が遅いので、もしコロニーが小さいようならもう1、2日待つとはっきり現れるはず。

1つのコロニーは、もともと1個の酵母菌が生育してできている。コロニーの中には100万個以上の酵母菌が増殖している。1コロニーは遺伝子導入された酵母菌が1ついたことを示すので、コロニーの数が遺伝子導入の効率を示すことになる。したがって、コロニーの数が多いと効率よく遺伝子を取り込まれたことを示す。



コロニーの数は、プレートを裏返して、プレートの底からコロニーを観察する。サインペンでコロニーに点を打ちながら数えると数え間違いがなくなる(写真)。多い場合は4分割して一分割分を数え4倍する。

一方「C」の最少培地には何も生えてこないはず。このプレートも生徒用に示すために冷蔵庫保存する。

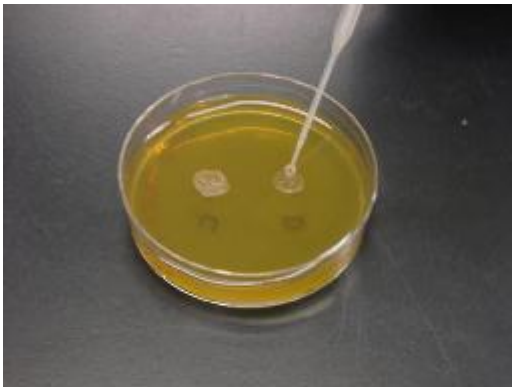
これらの最少培地に増殖した酵母は、アミラーゼ遺伝子も同時に導入されている。本実験の宿主酵母はアミラーゼを持たないので、新たにアミラーゼを持ちデンプンを分解する能力が付与された酵母菌が作製されたことになる。

次に遺伝子導入酵母菌が本当にアミラーゼを持ったかどうかを調べる。

### ・アミラーゼ活性検出準備 (10分)

アミラーゼ活性検出のために、まず、デンプン含有培地で酵母菌を増殖させる。

1. デンプン培地のウラ側にサインペンで点を2つ書く(写真)。1つに「T」、もう1つに「C」と記入する。
2. 遺伝子導入された酵母菌コロニーの数個をループでとり、それをデンプン培地の「T」点に合わせて培地上に5 mmぐらいの円形に塗る(どんな形状でもよい)。塗ったらすぐフタをする。
3. 冷蔵庫保存していたシャーレに生育している導入前酵母菌を「C」点上に同様に5 mmぐらいの円となるように塗る。塗ったらすぐフタをする。
4. フタをして室温(30℃がよい)で静置する。翌日からデンプン検出可能であるが1週間おいてもよい。



T (Transformed) : 形質転換された  
C (Control) : 対照

## 5日め：アミラーゼ活性の検出（10分）

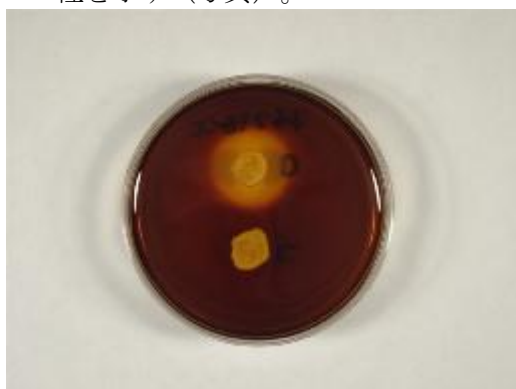
用意するもの

酵母菌を塗ったデンプン培地	1枚
スポイト（個別包装でないもの）	1本
発色液	1本（3 ml）

1. 酵母を塗った培地のフタをあけ、2 ml程度の発色液をスポイトで2つの酵母菌の周りにそっと落とします（写真）。プレート一面に発色液を入れる。



2. すぐにヨウ素デンプン反応が始まり、プレートが紫色を示すはず。ただし、アミラーゼ導入酵母の周りには透明のはず（写真）。この透明帯をハロと呼ぶ。しかし、「C」の酵母株の周りには透明帯がないはず。このハロがアミラーゼ活性を示す（写真）。



遺伝子導入酵母菌から分泌されたアミラーゼによりデンプンが分解されるので酵母菌の周りにはデンプンがなくなる。デンプンはヨウ素デンプン反応で紫色として検出されるので、デンプン培地上で培養したアミラーゼを持つ酵母とその周りにヨウ素液（発色液）をふりかけると酵母菌の周囲はデンプンがないので透明になる。

注意：紫色は時間が経つと消えるが、その場合はもう一度発色液をたらしせば色がでる。ただし、酵母菌が発色液で流れるのできれいな状態は維持できない。デジタルカメラで写真を撮っておくと結果が保存できる。



# 生徒用実験本番日程案

2週分と3週分の日程案を示します。一週間単位で授業が行われていると考えての日程案です。適宜進展や時間に合わせて計画してください。最短は予備実験の日程となります。

生徒用グループ実験には予備実験で行った DNA を入れない場合の遺伝子導入実験は含めていません。その実験を生徒に行わせたい場合は、5 グループ分として使用してください。

## 「3週分の実験日程案」

実験前日 「実験準備：前培養」 20分

実験直前準備 42℃湯浴の準備  
第一回め実験 「酵母菌への遺伝子導入」  
実験概要説明 5分  
酵母菌への遺伝子導入操作 20分  
DNA-酵母菌混合液の42℃保温(講義) 20分  
混合液の最少培地へひろげる操作 10分  
後片付け 5分

1週間後  
第二回め実験 「遺伝子導入酵母の観察」  
実験概要説明 5分  
形質転換培地の観察とコロニー数測定 10分  
酵母菌のでんぷん培地への塗布 10分  
講義 35分

1日から1週間後  
第三回め実験 「アミラーゼ活性の検出」  
実験概要説明 5分  
でんぷん分解の検出 20分  
講義 35分  
(またはアミラーゼ活性測定キットの利用)



## 「2週分の実験日程案」

実験前日	「実験準備：前培養」	20分
第一回目実験直前	42℃湯浴の準備	
第一回め実験	「酵母菌への遺伝子導入」	
	実験概要説明	5分
	酵母菌への遺伝子導入操作	20分
	DNA-酵母菌混合液の42℃保温(講義)	20分
	混合液の最少培地へひろげる操作	10分
	後片付け	5分
6日後		
第二回め実験前日	酵母菌のでんぷん培地への塗布	10分
1週間後		
第二回め実験	「遺伝子導入酵母の観察とアミラーゼ活性の検出」	
	実験概要説明	5分
	形質転換培地の観察とコロニー数測定	10分
	実験概要説明	5分
	アミラーゼ活性の検出	15分
	講義と考察	20分
	後片付け	5分

実験は講義を含め説明を行いながら、3回か2回で完結するように計画しています。2回で完結させるためには、第二回目実験の前日に酵母菌のでんぷん培地への塗布を生徒か先生が行う必要があります。これは、酵母菌を培養する時間が最低一日必要なためです。

最小限の時間で行う場合も、3～4日（温度が30℃ならば2日）の酵母菌の遺伝子導入体がコロニーとして観察できるまでの培養時間が必要です。授業の進展具合に合わせて計画してください。コロニーは冷蔵庫で保存できます。

**アミラーゼ活性検出キット**はだ液の酵素活性を検出する実験キットです。本実験キットと併用することで遺伝子からタンパク質、酵素を身近な内容として学習することができます。

予備実験を行った場合は、容易に実験が理解できると思います。生徒人数やグループに合わせた実験準備を行ってください。実験に失敗するグループも出てくるのが普通ですが、失敗をよいきっかけとして利用すると同時に、失敗をカバーできるように予備実験での結果や写真を保存して、本番実験で利用できるようにしておくとよいでしょう。

# 生徒用本番実験

## 第一回め実験前日(または2日前でも可) 所要時間 10分

先生による本番実験用の準備です。予備実験の前培養と同じですが2グループでYPD培地1枚分を用意する。

用意するもの (10グループ分：グループ数によりYPD培地枚数を調整)

酵母菌本番用 (-20℃保存)	1本
YPD培地	5枚
スポイト	1本

1. 凍結した酵母菌チューブを溶かす。
2. YPD培地を5枚用意しフタを上にして並べて置く。
3. 滅菌済スポイトを用意し、スポイトの目盛りで酵母菌を約0.3 ml分を1枚のYPD培地のたらし、計5枚に入れる。たらしたらすぐにフタをする。
4. たらした酵母液をシャーレを傾けながら広げる。
5. 室温で実験まで1-2日置きます。30℃前後に保温できると増殖は最もよい状態になります。寒い場合は2日の方がよい。

### 注意事項

微生物の混入を防ぐため、プレートのふたを開ける時間を最小限にとどめること。少々の混入は問題とならないが、決して混入した菌の方を遺伝子導入操作にもちいないこと。

ガスバーナーの横で操作すると落下する微生物がいなくなるので混入はほとんどなくなる。また、酵母菌にもちいるスポイトの先が手や服、実験台等にあたらないように注意する。

YPD培地は培養後に他の微生物の混入が観察された場合は、上の残りのプレートを使い回せば実験は充分できる。

もし冷凍酵母菌がなくなった場合、予備実験等でのYPD培地上に増殖した酵母菌をそのままループで新しいYPD培地に塗って用意すればよい。

# 第一回め 「酵母菌への遺伝子導入」

## 実験当日の準備

生徒をグループに分けておく。グループ数に合わせてキット内容を分割しておく。

### 用意するもの（1グループ分の数）

前日準備した酵母菌培養プレート	1枚/2グループ（写真）
DNA液	1本（室温で解かす）
遺伝子導入液	1本（室温で解かす）
ループ	1本
最少培地	1枚
滅菌済スポイト	2本
スプレッター	1本

### 用意するもの（実験室に一つ）

42℃の湯浴（写真）	
フロート	1枚

## 実験直前の準備

### 42℃の湯浴

恒温水槽があればよいが、なべに水をいれて温め、42℃に保温する。冷えて温度が下がっても42℃～35℃程度であればよい（但し、42℃以上にはならないように）。湯が多ければ保温がよいので2リットル以上は欲しい。

## 第一回め実験の流れ

5分概要説明→20分の操作→20分の湯浴静置（空き時間で講義）→10分の操作→5分片付け

1. 実験概要の説明の後、遺伝子導入実験用セットを生徒に確認させる。袋から出さないことを注意。滅菌操作も理解させる。
2. 前日用意したYPDプレートに生育している酵母菌を2グループに1枚ずつわたす。  
酵母菌の説明。
3. 実験操作開始  
前日用意したYPDプレート上に生育している酵母菌をかきとり棒のループ側でできるだけ多く集める。寒天培地をかきとった場合もあまり気にする必要はない。
4. 「ループ」の酵母菌全部を遺伝子導入液に直接入れる。米粒程度は必要。



5. 滅菌済スポイトを用いて「DNA」マイクロチューブの中に入っているDNA溶液すべてを酵母菌の入った遺伝子導入液に入れる。



6. 入れた後、スポイトで液を吸ったり出したりを繰り返すことで酵母菌を懸濁する（均一に酵母菌を遺伝子導入液に混ぜる）。この懸濁操作は重要なので、5回から10回行う。

7. 付属の「フロート」にチューブを差し込み 42℃（42℃以上の温度では酵母が死に始めるので注意）に 20 分間置く。湯浴は冷めていくと効率がある程度落ちるが問題とはならない。途中で熱して 42℃を維持する場合でも決してそれ以上の温度にならないように注意する。

（この 42℃の時間をのばせば遺伝子導入効率が上昇する。また、室温に静置していても遺伝子導入が可能で、その場合は 1 日（約 24 時間）で高い遺伝子導入率が得られる。高校の実験時間を考慮して、このマニュアルでは 20 分を設定しているが、室温で 1 日置き翌日次の操作に移ってよい。また、42℃は 2 時間程度が最も高い効率を示す。42℃がなぜ遺伝子導入効率を上げるのかはまだわかっていない。）

8. この 20 分間に説明を行う。

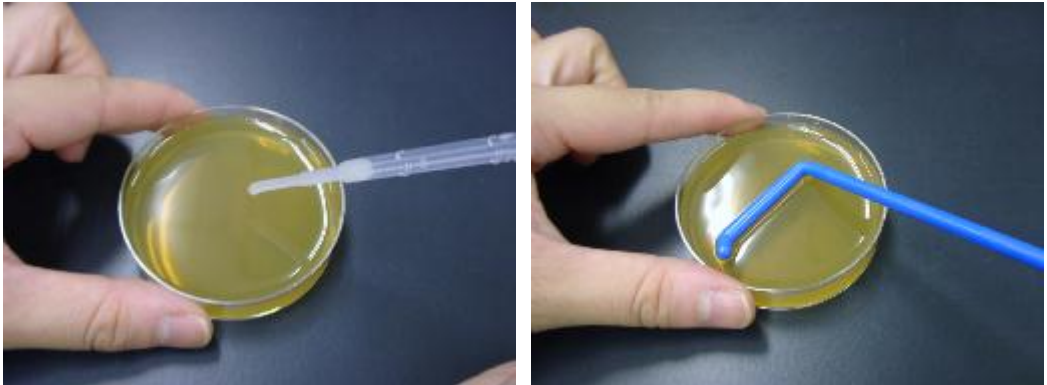
9. 42℃に静置した酵母-DNA 混合液を最少培地にまく。

新しい滅菌済スポイトを袋から出し、酵母-DNA 混合液を 2~3 回スポイトで吸ったり出したりして混合後、その全部を最少培地にの中心に液をたらす。たらしたらすぐにフタをしめる。

10. 「スプレッダー」で液をプレート上に均一に引き伸ばす。プレートを回しながらスプレッダー前後に動かせば均一に広がる。水分が残っているうちに引き伸ばしをやる。

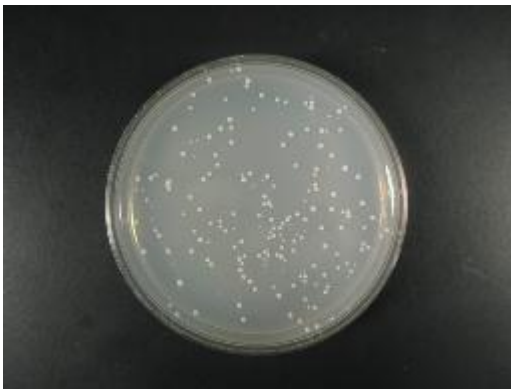
乾いた後にスプレッダーで引き伸ばしますと菌を取り除くことになるので注意が必要。やりすぎは禁物です。引き伸ばすとすぐにフタをする。

フタを長い間空けないことも重要。空気中の微生物が混入する。



10. ふたにグループの名前を書く。

11. 室温で3-7日、白いコロニーが現れるまで置いておく。もし、28°Cから30°Cの恒温庫があれば、約2日で現れる。混入した酵母以外の微生物が現れたら冷蔵庫に入れる必要がある。カビが混入するとプレートがカビで覆われてしまうので注意。生徒には毎日か、2日おきに遺伝子が入った酵母が現れるまでの観察をさせるとよい。



### 考えよう！

ヒトと酵母菌はどれくらい似ていると思いますか？  
ヒトのDNAと酵母菌のDNAはどれくらい違いがあるのでしょうか？  
ヒトの遺伝子を酵母菌にいれたらどうなると思いますか？  
どんな遺伝子をどんな生物に入れると役に立つのでしょうか？  
パンがふくらむのはなぜでしょう？

### 発展実験

- ・ 酵母菌の顕微鏡観察
- ・ DNAを取り出す実験
- ・ DNAの暗号解読演習
- ・ インターネットによる遺伝子情報の収集

## 第二回め 「遺伝子導入酵母の観察」

### 第二回め実験の流れ

5分概要説明→最小培地の観察とコロニー数計測→アミラーゼ活性検出準備→35分の講義

#### 用意するもの（1グループ分）

遺伝子導入酵母コロニー	
の生育した最少培地	1枚（写真）
デンプン培地	1枚
ループ	2本
サインペン	1本

#### 用意するもの（実験室に一つ）

導入前酵母菌	1枚
--------	----

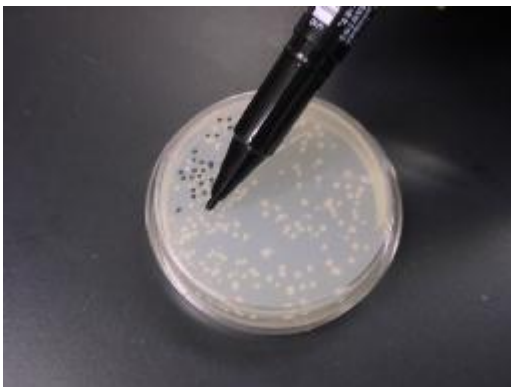
#### ・ 観察

「D」の最小培地に白い小さなもり上がった丸い点がいくつも現れているはず。個々の点をコロニーと呼ぶ。冬場では気温が低いと酵母菌の成長が遅いのでもしコロニーが小さいようならもう一日か二日待つとはっきり現れる。

一つのコロニーは、もともと一個の酵母菌が生育してできている。コロニーの中には100万以上の酵母菌が増殖している。1コロニーは遺伝子導入された酵母菌が一ついたことを示すので、コロニーの数が遺伝子導入の効率を示すことになる。したがって、コロニーの数が多いと効率よく遺伝子が入り込まれたことを示す。

コロニーの数は、プレートを裏返して、プレートの底からコロニーを観察します。サインペンでコロニーに点を打ちながら数えると数え間違いがなくなる（写真）。多い場合は4分割して一分割分を数え4倍する。

これらの最小培地の増殖した酵母は、アミラーゼ遺伝子も同時に導入されている。



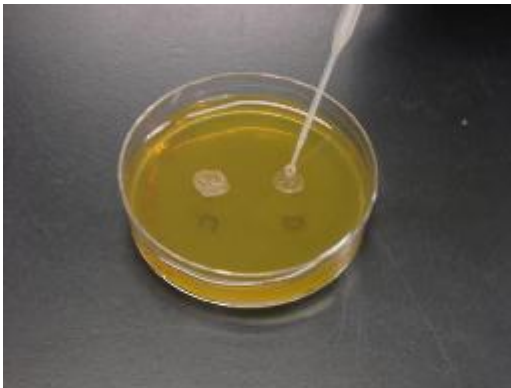
アミラーゼを酵母菌は持たないので、新たにアミラーゼを持ちでんぷんを分解する能力が付与された酵母菌が作製されたことになる。

次に遺伝子導入酵母菌が本当にアミラーゼを持ったかどうかを調べる。

## ・ アミラーゼ活性検出準備（10分）

アミラーゼ活性検出のために、まず、デンプン含有培地で酵母菌を増殖させる。

1. デンプン培地のウラ側にサインペンで点を2つ書きます（写真）。その1つに「T」、残りに「C」と記入する。
2. 遺伝子導入された酵母菌コロニーの数個をループでとり、それをでんぷん培地の「T」点に合わせて培地上に5 mm ぐらいの円形に塗る（どんな形状でも問題はない）。すぐフタをする。
3. 導入前酵母菌を「C」点上に同様に5 mm ぐらいの円形に塗る。すぐフタをする。
4. 室温（28℃～30℃がよい）で静置する。翌日から活性検出可能である1週間おいてもよい。



### 考えよう！

空気中や口の中に微生物はいると思いますか？

殺菌とはどういうこと？

コロニーになると酵母菌も目で見えます。コロニーにはいくつの酵母菌がいると思いますか？

遺伝子が導入できたとわかるのはなぜでしょう？

でんぷんとは何？

だ液中のでんぷん分解酵素アミラーゼ

消化と吸収

細胞と酵素反応など

### 発展実験

- ・ 空気中微生物の検出実験
- ・ 遺伝子導入効率に与える温度、時間の影響

## 第三回め 「アミラーゼ活性の検出」

### 第三回め実験の流れ

5分概要説明→アミラーゼ活性検出（10分）→35分の講義（発展実験も可能）

用意するもの（1グループ分）

酵母を塗ったでんぷん培地	1枚
スポイト	1本
発色液	1本（3 ml）

でんぷん培地に塗布した酵母菌がプレートに白く増殖しているはずです。このプレートにヨウ素を反応させ、でんぷんを検出します。

1. 酵母を塗った培地のフタをあけ、2 ml 程度の発色液をスポイトで2つの酵母菌の上とその周りにそっと落とします（写真）。プレートは振らないように。



2. すぐにヨウ素でんぷん反応が始まり、プレートが紫色を示すはず。ただし、アミラーゼ導入酵母の周りは透明のはず（写真）。この透明帯をハロと呼ぶ。しかし、「C」の導入前酵母株の周りには透明帯がないはず。このハロがアミラーゼ活性を示す。酵母菌から分泌されたアミラーゼによりでんぷんが分解されるので酵母菌の周りにはでんぷんがなくなる。でんぷんはヨウ素でんぷん反応で紫色として検出されるので、でんぷん培地上で培養したアミラーゼを持つ酵母とその周りにヨウ素液（発色液）をふりかけると酵母菌の周囲はでんぷんがないので透明になるが、アミラーゼを持たない酵母菌の周りは紫色となる（写真）。

注意：紫色は時間が経つと消えるが、その場合はもう一度発色液をたらしせば色がでる。ただし、酵母菌が発色液で流れるのできれいな状態は維持できない。デジタルカメラで写真を撮っておくとよい。



## 考えよう!

だ液にアミラーゼがないとどうなる？

胃腸薬のアミラーゼはどんな生物からとってきたものでしょう？

カビにアミラーゼがあるのはなぜでしょう？

## 発展実験

- ・ だ液のアミラーゼ検出実験
- ・ 胃腸薬のアミラーゼ検出実験
- ・ アミラーゼを使った酵素反応実験 最適温度, 最適 pH

## おわりに

生物学は日々進化しています。生物科学の進歩は私たちの生活も大きく変えていきます。高校で学ぶ生物学も、化学も、分子的な生命科学に関する内容を大幅に増やしています。特に、遺伝子やタンパク質という化学的分子から細胞や個体を理解する分子生物学の知識の習得がこれからの生物学では必須の科目となっています。

一方で、生物学は覚えることが多いと思っている生徒が多いのではないのでしょうか。理科は、考えることが大切です。実験を通して、考える喜びを知ることが理科の醍醐味であると思います。科学は、「なぜだろうか？」と疑問を発するところから始まります。小さな子供の頃にあった好奇心が、中学、高校となっていくにつれてしぼんでしまっていないのでしょうか。子供たちに学ぶ喜びや、まだわからない疑問を解く喜びを体験させることができるのは実験です。

このキットは山口大学工学部応用化学工学科の学生と一緒に作ったものです。また、研究室のメンバーも卒業研究や修士論文研究で忙しいなか、キット作製を手伝ってくれました。皆さんに感謝致します。先生方のご意見やご感想が新しい生命科学の教育や発展に必要です。是非、ご意見ご感想をお寄せください。

## 参考書

- 酵母 [究極の細胞] 柳田充弘編 ネオ生物学シリーズ 共立出版 2200 円  
暮らしの中の酵素 太田隆久著 科学のとびら 19 東京化学同人 1200 円  
遺伝子組換え食品 新しい食材の科学 日本農芸化学会編 暮らしの中の化学  
と生物 7 学会出版センター 1800 円  
遺伝子組換え植物の光と影 山田康之, 佐野浩 編著 学会出版センター 1900 円  
発酵食品への招待 一食文明から新展開まで 一島英治著 裳華房 1200 円  
遺伝子と夢のバイオ技術 野島博著 羊土社 1600 円  
暮らしと微生物 改訂版 村尾澤夫・藤井ミチ子・荒井基夫 共著 培風館 1900  
円  
生物工学実験書 改訂版 日本生物工学会編 培風館 4900 円  
日本科学の先駆者高峰讓吉 アドレナリン発見物語 山嶋哲盛著 岩波ジュニア  
新書 780 円  
生化学の夜明け 醗酵の謎を追って 丸山工作著 中公新書 700 円  
パストゥール ルネ・デュボス著 学会出版センター  
人に役立つ微生物のはなし 日本農芸化学会編 暮らしの中の化学と生物 8 学会  
出版センター 1800 円  
お酒のはなし 酒はいきもの 日本農芸化学会編 暮らしの中の化学と生物 2 学  
会出版センター 1600 円  
DNA農業 岡田吉美著 共立出版 1600 円

## インターネットサイト

- <http://www.yeastgenome.org/>  
<http://www.barrelhouse.com/yeast.html>  
<http://www.yeastgenome.org/ArtOfBrewing.htm>  
[http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/seimei/index.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/index.htm)

# 付録

## 組成

### 酵母菌

種名： *Saccharomyces cerevisiae* サッカロミセス セレビシエ

和名： 出芽酵母，酒酵母，パン酵母（いずれも同一種）

株名： BY4700 株（全遺伝子配列を解読してある）

由来： S288C 由来（研究用酵母の代表的株由来）

遺伝子型： *MATa ura3Δ0*

*MATa*: 酵母にも雌雄があります。交配型 (mating type) と呼びます。酵母の雌雄を決める遺伝子が *MAT* であり、この株は **a** 型です。

*ura3Δ0*: ウラシル合成遺伝子である *URA3* (orotidine-5'-phosphate decarboxylase をコードしている) が破壊されていることを示す。この遺伝子が欠損することでウラシル (RNA の塩基の一つ) が合成できなくなり、ウラシルがない培地では生育できない。

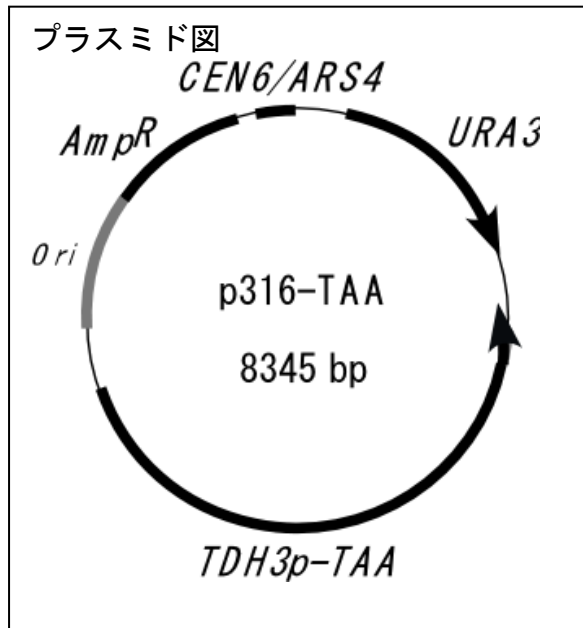
参考: 酵母では遺伝子を通常や 3 文字と数字で示す。大文字斜体で書かれていれば野生型 (正常遺伝子)，小文字斜体で書かれていれば変異型 (劣性遺伝子) という使い方が決められている。Ura3 のように初め 1 文字大文字，残り 2 文字小文字で斜体ではない標準文字ならその遺伝子がコードするタンパク質を示す。さらに *ura3Δ0* の  $\Delta$  は遺伝子が 1 塩基の変異等ではなく，長い領域が削除されていることを示し， $\Delta 0$  の 0 はその領域のタイプを 0 番と命名したことを意味する。

形状： 酵母菌を 15% グリセロール液に懸濁。冷凍保存可能となる。

### DNA 液

0.05 ml (50  $\mu$ l) の 0.02 mg/ml のプラスミド DNA (pRS316TAA 図)

プラスミドとは遺伝子を運ぶための環状 DNA です。遺伝子の運び屋をベクターと呼びますが，その内の一種です。特徴は，宿主に導入されたときにプラスミドが複製できる複製配列と導入されたかどうかを判断できるマーカージンを持たせてあります。p316TAA は，大腸菌への導入に必要なマーカージンである抗生物質耐性遺伝子 (アンピシリン耐性遺伝子:  $Amp^R$ ) と大腸菌内で複製できる複製起点 (*ori*) を持ちます。さらに，酵母への導入に必要なマーカージンである *URA3* (ウラシル合成遺伝子) と酵母内で複製できる複製配列 (*ARS4*) を持っています。それに



それに *Aspergillus oryzae* のアミラーゼ遺伝子を持っています。

### 遺伝子導入液

- 40% ポリエチレングリコール 4000
- 0.1 M DTT (ジチオスレイトール)
- 0.2 M 酢酸リチウム

### YPD培地

- 2% グルコース
- 1% イーストエキストラクト
- 2% ポリペプトン
- 0.004% ウラシル
- 2% 寒天

オートクレーブ 121°C, 15 分。寒天をオートクレーブで溶かして滅菌した後、プラスチックシャーレに注ぎ (約 30 ml) フタをして放置。固まったら使用できる。袋に入れて冷蔵庫保存する。

### でんぶん培地

- 2% グルコース
- 1% イーストエキストラクト
- 2% ポリペプトン
- 1% 可溶性でんぶん
- 2% 寒天

クエン酸-リン酸バッファー pH 6.0 (20 mM クエン酸と 40 mM リン酸を 37 : 63 となるよう混ぜ合わせて pH6) に上記成分を溶かす。オートクレーブ 121°C, 15 分。プレートを作製。

### 最少培地

- 0.17% イーストナイトロジェンベース (アミノ酸, 硫酸アンモニウムなし)
- 0.5% 硫酸アンモニウム
- 2% グルコース
- 2% 寒天

オートクレーブ 120°C, 15 分。

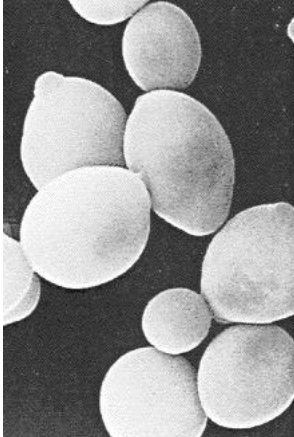
この培地には栄養であるウラシルが入っていない。

### 発色液

- 0.1% ヨウ素, 1% よう化カリウム

発色液はイソジンうがい液を似た成分です。イソジンうがい液を 10 倍希釈しても同様の結果が得られます。

**酵母菌電子顕微鏡像**



**酵母菌光学顕微鏡像**



### **アミラーゼ遺伝子の cDNA 配列**

```
atgatgggtcgcggtgggtggtctctatctgtacggccttcaggtcgcggc  
acctgctttggctgcaacgcctgctggactggcgatcgcaatccatttatt  
tccttctcacggatcgatttgcaaggacggatgggtcgacgactgcgact  
tgaatactgcgatcagaaatactgtgggtggaacatggcagggcatcat  
cgacaagtggactatatccaggggaatgggcttcacagccatctggatca  
ccccgttacagcccagctgccccagaccaccgcataatggagatgcctac  
catggctactggcagcaggatatatactctctgaacgaaaactacggcac  
tgcagatgacttgaaggcgctctcttcggcccttcatgagagggggatgt  
atcttatgggtcgatgtggttgctaaccatatgggctatgatggagcgggt  
agctcagtcgattacagtgtgtttaaacggttcagttccaagactactt  
ccaccggttctgtctcattcaaaaactatgaagatcagactcaggttgagg  
attgctggctaggagataaacactgtctccttgctgatctcgataaccacc  
aaggatgtgggtcaagaatgaatggtaacgactgggtgggatcattgggatc  
gaactactccattgacggcctccgatcgcacacagtaaaacacgtccaga  
aggacttctggcccgggtacaacaaagccgcaggcgtgtactgtatcggc  
gaggtgctcgacgggtgatccggcctacacttgtccctaccagaacgtcat  
ggacggcgtactgaactatcccatttactatccactcctcaacgccttca  
agtcaacctccggcagcatgcacgacctctacaacatgatcaacaccgtc  
aatccgactgtccagactcaacactcctgggcacattcgtcgagaacca  
cgacaacccacggttcgcttcttacaccaacgcacatagccctcgccaaga  
acgtcgcagcattcatcctcaacgacggaatccccatcatctacgcc  
ggccaagaacagcactacgcggcggaacgaccccgcgaaccgcgaagc  
aacctgggcttcgggtaccggaccgacagcgcgagctgtacaagttaattg  
cctccgcgaacgcaatccggaactatgccattagcaaagatacaggattc  
gtgacctacaagaactggcccattctacaagacgcacacaacgatcgccat  
gcgcaagggcacagatgggtcgagatcgtgactatcttgtccaacaagg  
gtgcttcgggtgattcgtataccctctccttgagtgggtgcgggttacaca  
gccggccagcaattgacggaggtcattggctgcacgaccgtgacgggttg  
ttcggatggaaatgtgcctgttcctatggcaggtgggctaccctagggtat  
tgtatccgactgagaagttggcaggttagcaagatctgtagtagctcgtga
```

### 遺伝暗号表

TTT	<b>F</b>	TCT	<b>S</b>	TAT	<b>Y</b>	TGT	<b>C</b>
TTC	<b>F</b>	TCC	<b>S</b>	TAC	<b>Y</b>	TGC	<b>C</b>
TTA	<b>L</b>	TCA	<b>S</b>	TAA	<b>STOP</b>	TGA	<b>STOP</b>
TTG	<b>L</b>	TCG	<b>S</b>	TAG	<b>STOP</b>	TGG	<b>W</b>
CTT	<b>L</b>	CCT	<b>P</b>	CAT	<b>H</b>	CGT	<b>R</b>
CTC	<b>L</b>	CCC	<b>P</b>	CAC	<b>H</b>	CGC	<b>R</b>
CTA	<b>L</b>	CCA	<b>P</b>	CAA	<b>Q</b>	CGA	<b>R</b>
CTG	<b>L</b>	CCG	<b>P</b>	CAG	<b>Q</b>	CGG	<b>R</b>
ATT	<b>I</b>	ACT	<b>T</b>	AAT	<b>N</b>	AGT	<b>S</b>
ATC	<b>I</b>	ACC	<b>T</b>	AAC	<b>N</b>	AGC	<b>S</b>
ATA	<b>I</b>	ACA	<b>T</b>	AAA	<b>K</b>	AGA	<b>R</b>
ATG	<b>M</b>	ACG	<b>T</b>	AAG	<b>K</b>	AGG	<b>R</b>
GTT	<b>V</b>	GCT	<b>A</b>	GAT	<b>D</b>	GGT	<b>G</b>
GTC	<b>V</b>	GCC	<b>A</b>	GAC	<b>D</b>	GGC	<b>G</b>
GTA	<b>V</b>	GCA	<b>A</b>	GAA	<b>E</b>	GGA	<b>G</b>
GTG	<b>V</b>	GCG	<b>A</b>	GAG	<b>E</b>	GGG	<b>G</b>

**アミラーゼ遺伝子の配列と翻訳したアミノ酸配列**  
**(数字:塩基番号/アミノ酸番号)**

1/1  
atg atg gtc gcg tgg tgg tct cta ttt ctg tac ggc ctt cag gtc gcg gca cct gct ttg  
M M V A W W S L F L Y G L Q V A A P A L  
61/21  
91/31  
gct gca acg cct gcg gac tgg cga tcg caa tcc att tat ttc ctt ctc acg gat cga ttt  
A A T P A D W R S Q S I Y F L L T D R F  
121/41  
151/51  
gca agg acg gat ggg tcg acg act gcg act tgt aat act gcg gat cag aaa tac tgt ggt  
A R T D G S T T A T C N T A D Q K Y C G  
181/61  
211/71  
gga aca tgg cag ggc atc atc gac aag ttg gac tat atc cag gga atg ggc ttc aca gcc  
G T W Q G I I D K L D Y I Q G M G F T A  
241/81  
271/91  
atc tgg atc acc ccc gtt aca gcc cag ctg ccc cag acc acc gca tat gga gat gcc tac  
I W I T P V T A Q L P Q T T A Y G D A Y  
301/101  
331/111  
cat ggc tac tgg cag cag gat ata tac tct ctg aac gaa aac tac ggc act gca gat gac  
H G Y W Q Q D I Y S L N E N Y G T A D D  
361/121  
391/131  
ttg aag gcg ctc tct tcg gcc ctt cat gag agg ggg atg tat ctt atg gtc gat gtg gtt  
L K A L S S A L H E R G M Y L M V D V V  
421/141  
451/151  
gct aac cat atg ggc tat gat gga gcg ggt agc tca gtc gat tac agt gtg ttt aaa ccg  
A N H M G Y D G A G S S V D Y S V F K P  
481/161  
511/171  
ttc agt tcc caa gac tac ttc cac ccg ttc tgt ctc att caa aac tat gaa gat cag act  
F S S Q D Y F H P F C L I Q N Y E D Q T  
541/181  
571/191  
cag gtt gag gat tgc tgg cta gga gat aac act gtc tcc ttg cct gat ctc gat acc acc  
Q V E D C W L G D N T V S L P D L D T T  
601/201  
631/211  
aag gat gtg gtc aag aat gaa tgg tac gac tgg gtg gga tca ttg gta tcg aac tac tcc  
K D V V K N E W Y D W V G S L V S N Y S  
661/221  
691/231  
att gac ggc ctc cgt atc gac aca gta aaa cac gtc cag aag gac ttc tgg ccc ggg tac  
I D G L R I D T V K H V Q K D F W P G Y  
721/241  
751/251  
aac aaa gcc gca ggc gtg tac tgt atc ggc gag gtg ctc gac ggt gat ccg gcc tac act  
N K A A G V Y C I G E V L D G D P A Y T  
781/261  
811/271  
tgt ccc tac cag aac gtc atg gac ggc gta ctg aac tat ccc att tac tat cca ctc ctc  
C P Y Q N V M D G V L N Y P I Y Y P L L  
841/281  
871/291

```

aac gcc ttc aag tca acc tcc ggc agc atg cac gac ctc tac aac atg atc aac acc gtc
N A F K S T S G S M H D L Y N M I N T V
901/301                               931/311
aaa tcc gac tgt cca gac tca aca ctc ctg ggc aca ttc gtc gag aac cac gac aac cca
K S D C P D S T L L G T F V E N H D N P
961/321                               991/331
cgg ttc gct tct tac acc aac gac ata gcc ctc gcc aag aac gtc gca gca ttc atc atc
R F A S Y T N D I A L A K N V A A F I I
1021/341                              1051/351
ctc aac gac gga atc ccc atc atc tac gcc ggc caa gaa cag cac tac gcc ggc gga aac
L N D G I P I I Y A G Q E Q H Y A G G N
1081/361                              1111/371
gac ccc gcg aac cgc gaa gca acc tgg gct tcg ggc tac ccg acc gac agc gag ctg tac
D P A N R E A T W A S G Y P T D S E L Y
1141/381                              1171/391
aag tta att gcc tcc gcg aac gca atc cgg aac tat gcc att agc aaa gat aca gga ttc
K L I A S A N A I R N Y A I S K D T G F
1201/401                              1231/411
gtg acc tac aag aac tgg ccc atc tac aaa gac gac aca acg atc gcc atg cgc aag ggc
V T Y K N W P I Y K D D T T I A M R K G
1261/421                              1291/431
aca gat ggg tcg cag atc gtg act atc ttg tcc aac aag ggt gct tcg ggt gat tcg tat
T D G S Q I V T I L S N K G A S G D S Y
1321/441                              1351/451
acc ctc tcc ttg agt ggt gcg ggt tac aca gcc ggc cag caa ttg acg gag gtc att ggc
T L S L S G A G Y T A G Q Q L T E V I G
1381/461                              1411/471
tgc acg acc gtg acg gtt ggt tcg gat gga aat gtg cct gtt cct atg gca ggt ggg cta
C T T V T V G S D G N V P V P M A G G L
1441/481                              1471/491
cct agg gta ttg tat ccg act gag aag ttg gca ggt agc aag atc tgt agt agc tcg tga
P R V L Y P T E K L A G S K I C S S S *

```

このDNA配列は正確には mRNA を基にした cDNA 配列です。染色体上の遺伝子の配列にはイントロンがあるのでこのように翻訳してきれいに示すことはできません。



## 家でもできる DNA をみる実験

遺伝子とは生命の設計図です。遺伝子は、DNA と呼ばれる物質でできています。人も植物も微生物も、すべての生物は、同じ DNA を設計図に用いています。

この実験では、DNA を魚の白子から取り出します。さて、どんなものなのでしょう。取り出した DNA の中に、魚を作り上げる情報が詰まっています。同じ DNA がすべての生物に含まれていて、生物を作り上げるの設計図になっていることを理解して下さい。

### ○用意するもの

- ・ 鱈（たら）などの魚の白子 50-100 g---魚屋に注文すれば手に入ります。お鍋に最適。  
冷凍庫で保存可能。10 g もあれば充分。
- ・ 台所用洗剤◆---ジョイ（P&G）を使っています。他の洗剤でも可能です。
- ・ エタノール ---薬屋で買えると思います。98-99%のもの。特級でも一級でも可。
- ・ 水---脱イオン水。水道水でも可。
- ・ 混ぜるもの---箸もストローでもピンセットでもなどなんでもよい。
- ・ プラスチックコップなどの容器。透明で観察しやすいもの。
- ・ ビニール袋---白子をつぶすため。手のひらサイズがよい。ジッパーがついていると便利。

### ○方法

- 1) 白子を 1 g 程度、小指の先ほど、をビニール袋に入れて指や手で 30 秒から 1 分ぐらいよくつぶします。つぶした後、水を 20 ml ぐらい入れる（容器半分量）。
- 2) つぶれた液をコップに移します。この時あまり、粒を入れないように気をつけます。
- 3) 新しいコップにつぶれた液をスポイトで 2 ml 移し、そこに水を 20 ml 入れます。
- 4) この中にジョイを 4, 5 滴たらし、かき混ぜます。この時どんな変化があるかを観察します。ここで、ジョイが油を溶かすので少し透明になることが観察できると思います。
- 5) 入っている液の 2 倍量（20 ml なら 40 ml のエタノール容器全量）を液の上に載せるように入れます。
- 6) それを箸などで、ゆっくりかき混ぜてみて下さい。だんだん箸の周りにひも状のものが巻き付いてくるのがわかると思います。これが DNA です。
- 7) DNA を観察してみて下さい。大変長いひも状の物質です。いかがですか。
- 8) うまくいかなるときは 3) の量を増やすか減らしてみてください。通常減らしたほうがうまくなります。

連絡先

山口大学工学部応用化学工学科

生物機能応用化学研究室

〒755-8611 宇部市常盤台 2-16-1

赤田倫治

星田尚司

T E L : 0836-85-9292

F A X : 0836-85-9201

e-mail : [rinji@yamaguchi-u.ac.jp](mailto:rinji@yamaguchi-u.ac.jp)

Web: <http://genetic.eng.yamaguchi-u.ac.jp>

改訂 2007年6月18日