

パン酵母とGFPを利用した 組換えDNA実験キット



新マニュアル

山口大学

キット内容（10グループ用+予備実験1回分付）

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
GFP遺伝子導入済み酵母菌*	(0.5 mL)	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
最少培地**		12枚	冷蔵庫(4℃)保存
+U培地**		12枚	冷蔵庫(4℃)保存
スプレッダー**		12本	1本毎個包装
ループ**		34本	1本毎個包装
滅菌済スポイト**		23本	1本毎個包装
フロート		1枚	
ムードランプ		1個	
オレンジフィルター		1枚	
ブルーフィルター		1枚	

*遺伝子導入済み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。

酵母株 RAK28849 *Saccharomyces cerevisiae* BY4743 cir0
(*MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 LYS2/lys2Δ0 met15Δ0/MET15 ura3Δ0/ura3Δ0 cir⁰*)

プラスミド DNA YHp29360 YHp[*TDH3p-eEGFP, EcOri-AmpR, URA3*]

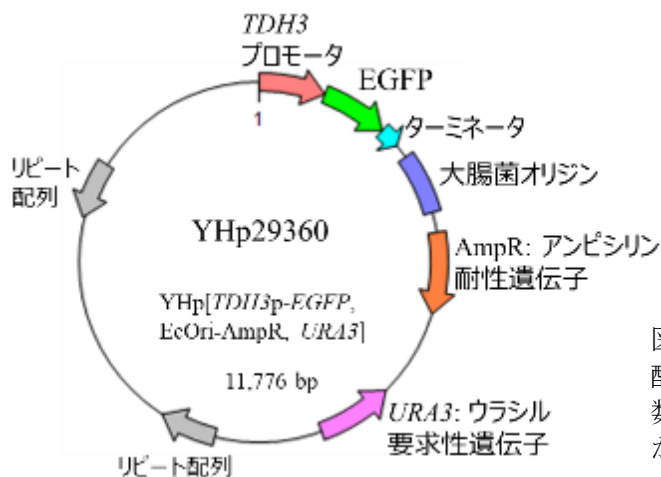


図 YHp29360 プラスミド

酵母 *S. cerevisiae* 細胞内でプラスミドの数が数百個にも複製され、導入遺伝子 (EGFP) から大量に GFP タンパク質を生産できる。

キットの保存

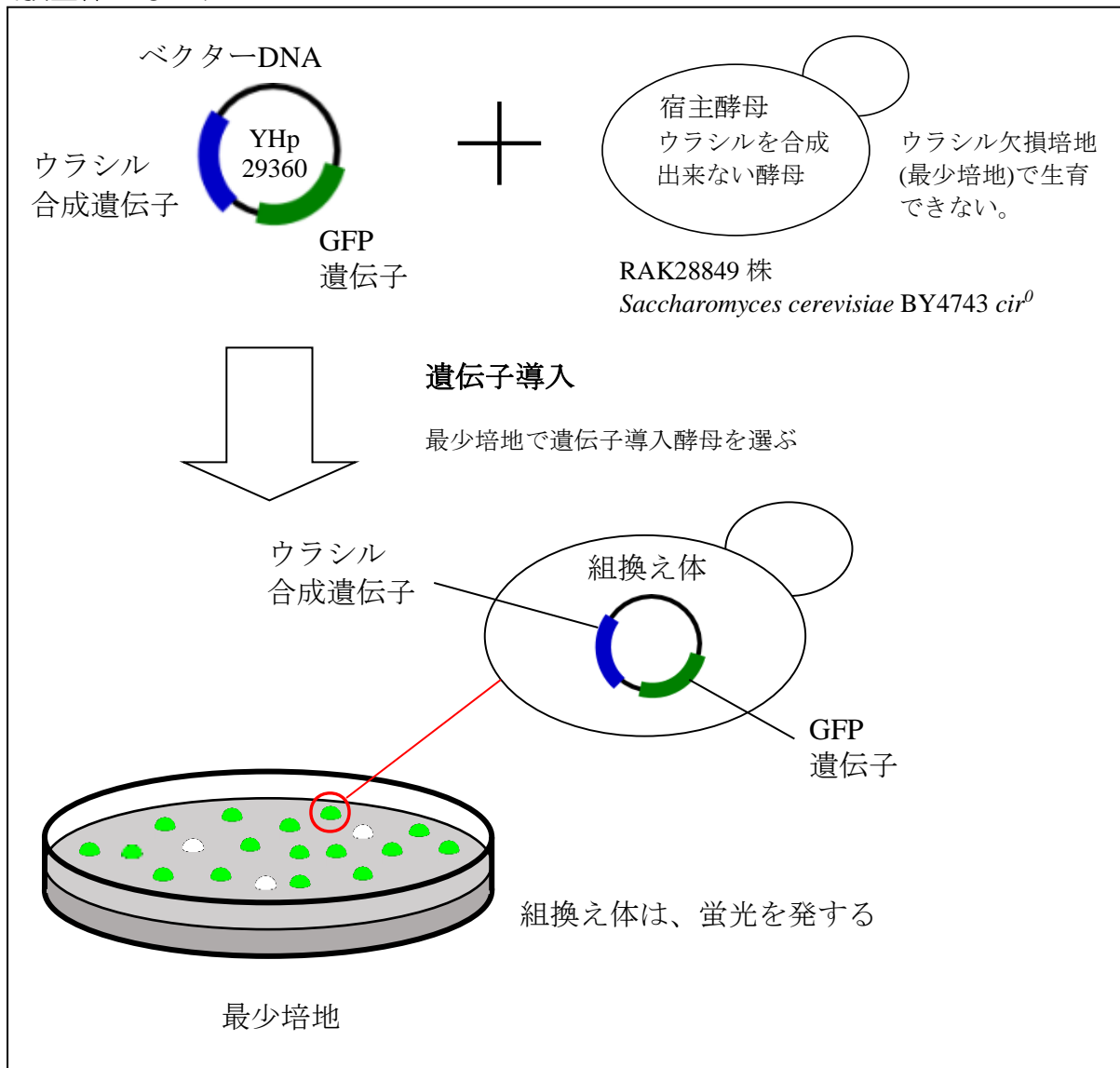
- ・ マイクロチューブに入っている酵母菌、DNA液、遺伝子導入液はまとめて冷凍庫(-20℃)に入れて保存してください。
- ・ プレート培地類も冷蔵庫に置いた方が長持ちしますが、室温で保存しても構いません。
- ・ 多くの器具は滅菌しています。袋を開けた場合でも保存する時には袋を閉じてください。

注意事項

このキットの組換えDNA実験は、安全であり、高等学校等でも実験できる法律上の基準を満たしています。通常の理科実験と同じように行いますが、実験中は以下を注意してください。

- ・ 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
- ・ 実験終了後に組換え体、実験器具を確実に滅菌

実験全体のながれ



実験材料

キットでは写真のような実験材料を使います。それぞれの名前を覚えてください。

培地プレート



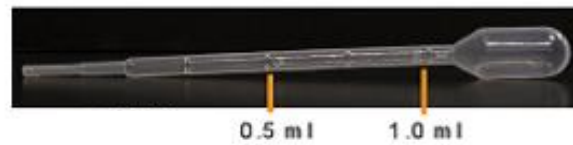
スプレッター



ループ



スポイト



酵母菌液



フロート

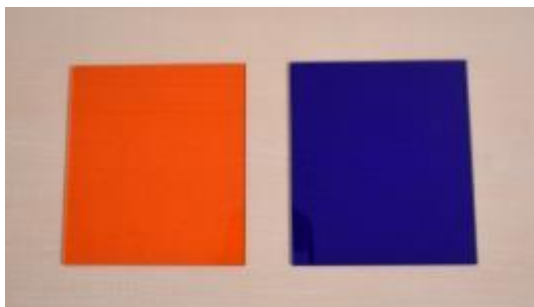


オレンジフィルター

アクリサンデー板 色番；252 オレンジ透明

ブルーフィルター

アクリサンデー板 色番；302 コバルト透明



LED 電球

株式会社 オーム電気
型番 LDA2A-G/CK AG93
ランプコードは付属していません。



GFPについて

GFPとは、緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein) の略で、1962年に下村脩さんが発見した。GFPは、分子そのもの自体が光り、紫外線や青色発光ダイオードに当てオレンジ色のフィルターを通して見るだけで発光する。また、オワンクラゲの生体内ではイクオリンと複合体を形成している。細胞内カルシウムを感知して発光するイクオリンは、単体では最大蛍光波長460nmの青色であるが、オワンクラゲの発色細胞内では、GFPがイクオリンから励起エネルギーを受け、最大蛍光波長508nmの緑色の蛍光を発する。

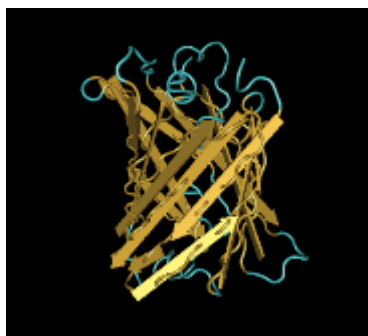
1960年代下村脩氏は、アメリカの西海岸で数十万匹のクラゲを採取した。1990年代チャルフィー氏はGFPの遺伝子をシノラブディス・エレガンスという線虫のゲノムに接合し、発光に関わる細胞を6個特定した。

GFPの発見以前には、分離精製したタンパク質に化学的に蛍光色素を結合し、細胞に付加するという方法が取られていたが、大変わずらわしい作業だった。GFPの発見により、比較的容易に細胞内のタンパク質を蛍光標識することが可能となり、蛍光イメージング法を発展させる。

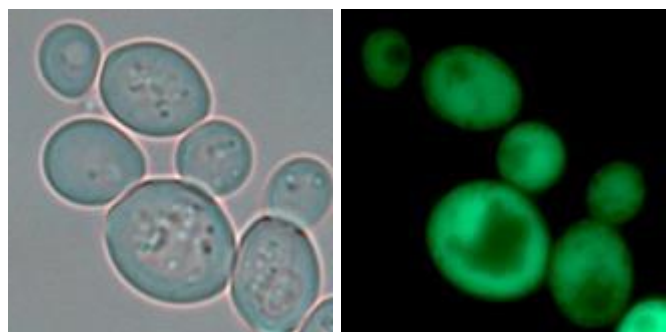
「魔法のマーカー」と呼ばれているGFPは、見えなかった生物学的な過程を可視化することができる。たとえば、がん細胞の転移や増殖の過程、アルツハイマー病やハンチントン病などの様々な病気の過程の可視化である。また、無毒で「リアルタイム」で使用できるため、動物を殺したり解剖したりすることなく生きたままの状態で行うことができるので、実験が途中で中断することもない。現在では、iPS細胞など、世界中の研究現場で用いられている。

下村さんは、有機化学・海洋生物学を専門とする生物学者であり、生物発光研究の先駆者である。1951年に長崎医科大付属薬学専門部 (現長崎大学薬学部) を卒業し、1963年に名古屋大学助教授、1982年に米ウッズホール海洋生物学研究所上席研究員になった。現在、下村さんは自宅の研究所で研究を続けている。

2008年下村さんは、「蛍光たんぱく質 (GFP) の発見」でノーベル賞を受賞した。下村さんは、GFPを取り出すために家族総出でクラゲ取りに励み、途中で投げ出さなかった。「子どもたちにはどんどん興味を持ったことをやらせてあげて。やり始めたら、やめたらだめですよ。」と、下村さんは言っている。



GFP の構造



蛍光顕微鏡観察
上：透過光、下：蛍光

組換えDNA実験

実験中の注意

指示があるまで実験材料の袋やフタを開けないこと。袋に入ったループ、スポイト、スプレッダーは滅菌されている。これらは操作の直前に出し、その先が手、服、実験台などにさわらないように注意する。さわった場合は使用せず新品と取り替える。さわることによって雑菌が混入することになる。

前日の準備

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。

1 時間めの実験準備

• 用意するもの (1グループ分)

酵母菌培養YPDプレート(写真)...	1枚/2グループ
DNA液.....	1本
遺伝子導入液.....	1本
ループ.....	1本
最少培地.....	1枚
スポイト.....	2本
スプレッダー.....	1本
サインペン.....	1本



前日から用意された酵母菌。
プレート上に培養している。
この酵母菌に遺伝子を導入する。

※1限目にて米粒程度ループで取る操作をした後の使用済みプレートは、冷蔵庫(冷凍庫は不可)に保存する。(後の実験で残りを使用する)

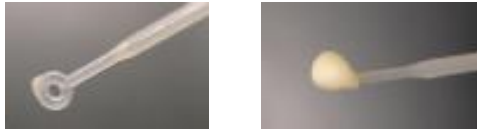
• 用意するもの (実験室に一つ)

42℃の湯浴.....	1つ
フロート.....	1枚

1 時間め実験「酵母菌への遺伝子導入操作」

実験操作

1. YPDプレート上に生育している酵母菌を「ループ」の先でかきとり米粒程度を集める。寒天培地はかきとらないようにするが入っても気にする必要はない。



2. ループに取った酵母菌を遺伝子導入液に直接入れる。



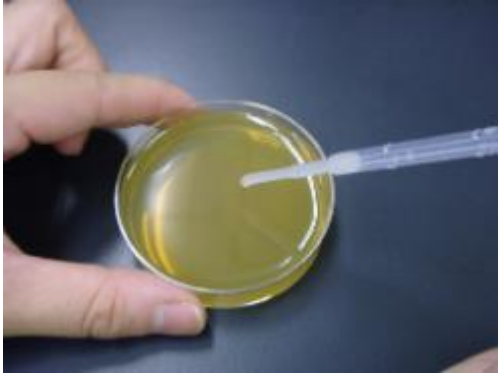
3. スポイトを用いて「DNA」チューブの中に入っているDNA溶液すべてを酵母菌の入った遺伝子導入液に入れる。

4. 入れた後、スポイトで液を吸ったり出したりを5回程度行うことで酵母菌を懸濁する(あまり泡立てないよう均一に酵母菌を遺伝子導入液に混ぜる)。



5. 付属の「フロート」に酵母菌とDNAを混合したチューブを差し込み42°Cの湯浴中に30分間置く(20分でも可。30分のほうが成功率が上がる)。

6. 30分後、新しいスポイトを袋から出し、42°Cに置いていた酵母-DNA混合液を2~3回吸ったり出したりして混合後、その全部を最少培地の中心に垂らす。垂らしたらすぐにフタをしめる。



7. 「スプレッダー」で液を最少培地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ない。引き伸ばすとすぐにフタをする。

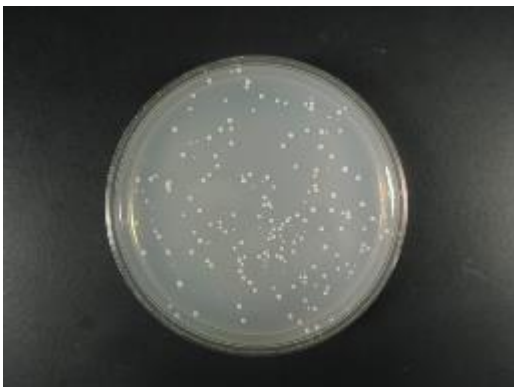
フタを長い間開けないことも重要。空気中の微生物が混入する。



8. フタに名前を書く。

9. 室温で4~7日間置いておく。30℃であれば3日。培養中もフタを開けてはいけない。

10. 毎日プレートを観察すると白い点が現れてくる。これが「コロニー」と呼ばれる遺伝子導入体である。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。



考えよう!

なぜ最少培地で酵母が生育すれば遺伝子が導入されたことになるのか?

ヒトと酵母菌はどれくらい似ている?

ヒトの遺伝子を酵母菌に入れたらどうなる?

どんな遺伝子をどんな生物に入れると役に立つ?

2時間の予習

GFPとは何かを調べておこう。

2時間め実験「遺伝子導入酵母の観察」

遺伝子導入操作のプレートを3日から7日培養した後に行う観察と3時間め実験の準備

実験準備

- 用意するもの（1グループ分）

- 酵母コロニーが現れた最少培地・・・ 1枚
- +U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）

- 遺伝子導入前酵母菌・・・・・・・・・・・・ 1枚
(1時間めに使用したプレートを冷蔵庫から取り出しておく)

観察

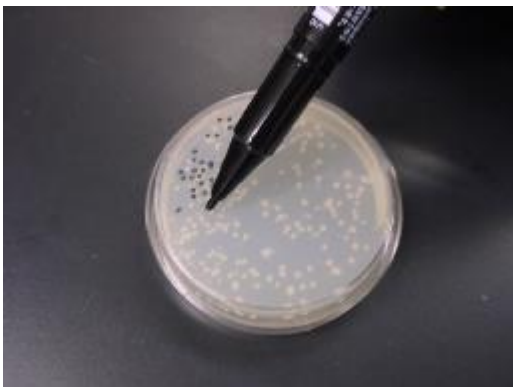
最少培地に白い小さなもり上がった丸い点がいくつも現れているはず。これらの点をコロニーと呼ぶ。培養温度が低いと酵母菌の成長が遅いのでコロニーが小さいようなら1日か2日待てば大きくなる。

1つのコロニーはもともと1個の遺伝子導入酵母菌が分裂増殖したものなので、コロニーの数は遺伝子が導入された酵母菌の数を示す。したがって、コロニーの数が多いプレートほど遺伝子導入がうまく行われたといえる。

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のあるところに点を打ちながら数えると数え間違いがない(写真)。数が多い場合は4分割して1区画を数え4倍する。

これらの酵母にはGFP遺伝子も同時に導入されている。GFP遺伝子を持たない酵母菌が新たにGFPを作れるようになり、特定の波長の光をあてることによって発光させることができることになる。

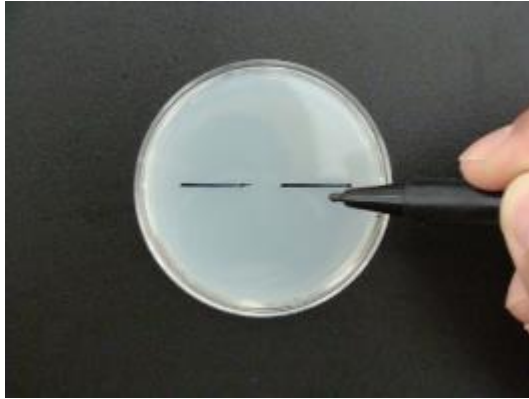
次に遺伝子導入酵母菌が本当にGFPを作られるようになったか調べる。



3時間めの準備

GFPが導入されたかを確認するために、遺伝子導入された酵母コロニーやGFP遺伝子導入前の酵母を+U培地で培養する。

1. +U培地のウラ側にサインペンでプレート中央に2本線を引く。



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、+U培地の一方に上に軽くのばす。
3. 遺伝子導入前の酵母をもう一方の線に軽く伸ばす。
4. 室温(30℃程度がよい)で静置する。2日から7日培養する。1日培養では光らない場合が多い。

考えよう!

誰のプレートのコロニー数が多かった?

どのような操作を改良すると効率よく遺伝子を導入することができると思う?

3時間目の予習

GFPが導入されたことを確認する方法を調べてみよう。

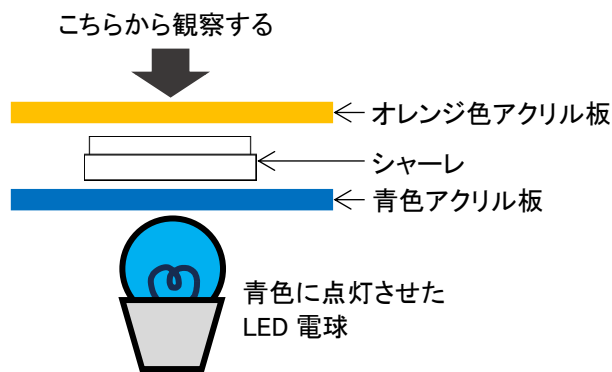
3時間め実験「実際に観察しよう」

前回用意した遺伝子導入酵母を塗った+U培地を使った実験

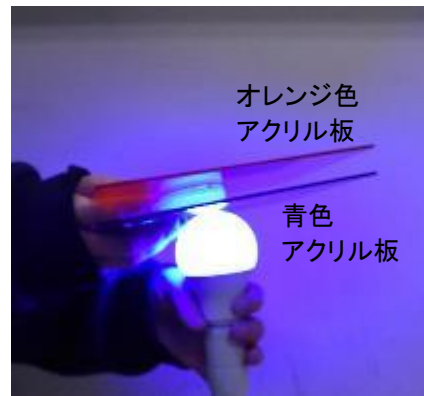
• 用意するもの（1グループ分）

- 酵母菌を塗った+U培地..... 1枚
- LED電球..... 1台
- オレンジフィルター..... 1枚

+U培地に塗った酵母菌がプレートに白く増殖しているはず。2日目以上の培養ではっきり観察できるようになる。ブルーフィルターとオレンジフィルターの上に酵母菌を塗った+U培地をはさむ。この時、シャーレのふた側をブルーフィルター側にする。ブルーフィルター側から青色ランプまたはLED電球（青色に点灯させる。青色に点灯させる方法は箱の側面に記載されています。）で光を当てて、オレンジフィルター側から観察してみると...



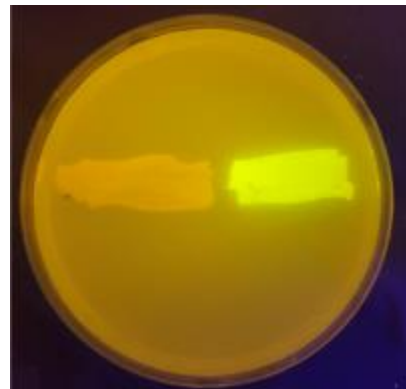
プレート、フィルター、ライトの位置関係



ライトを当てているときの様子



光を当てると



プレート上の酵母菌（左）と組換え体（右）

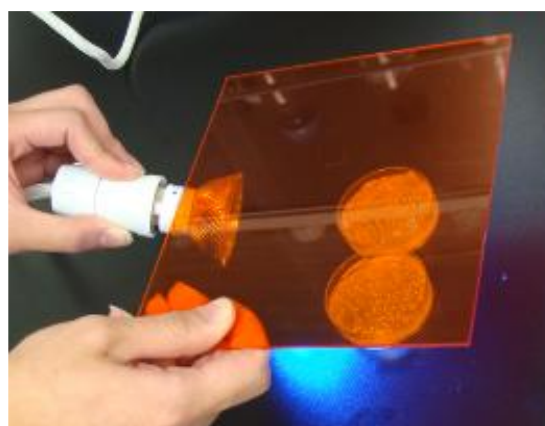
ブルートランスイルミネーターを用いても観察できる。



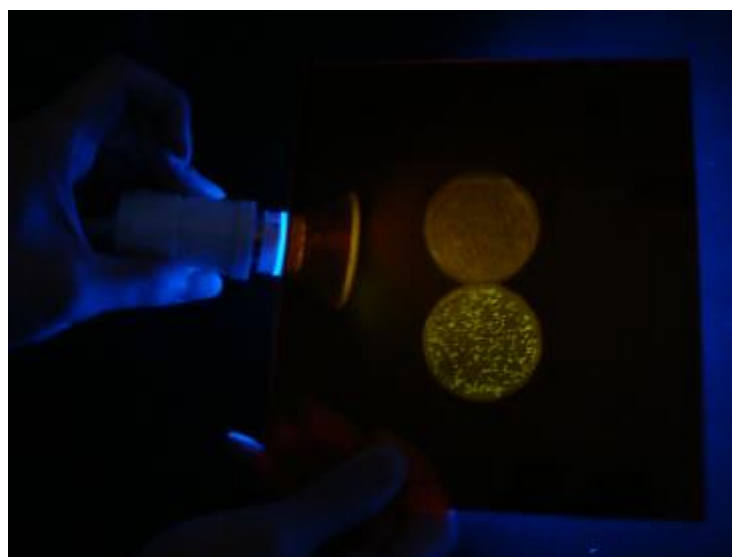
ミニゲル用青色 LED トランスイルミネーター
カタログ番号 LEDB-SBOX

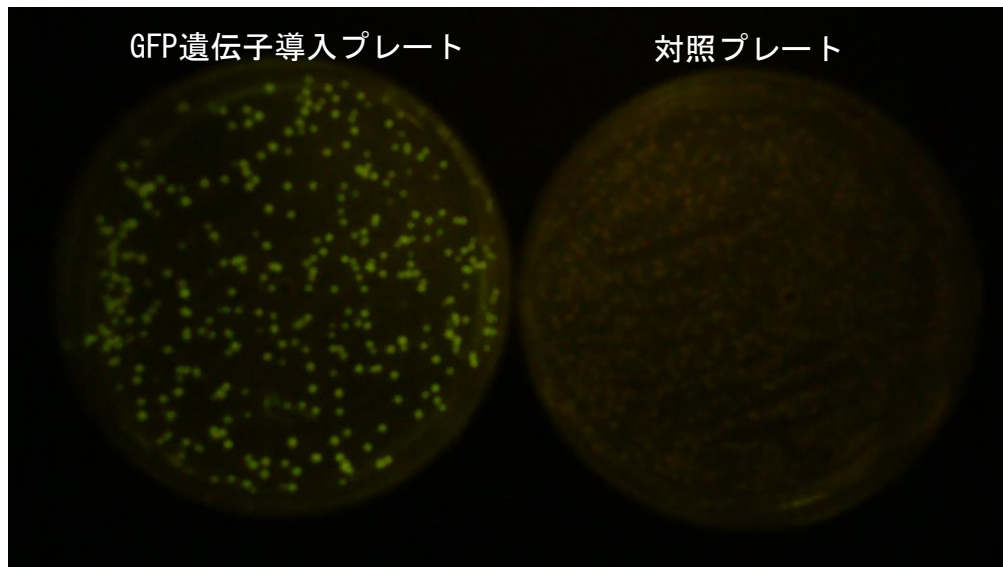
または、形質転換したプレート上のコロニーを直接観察することもできる。培養日数が長いので、こちらのコロニーの方が強い光を示す。

右の写真のように青色光をあて、オレンジフィルターを通して観察する。部屋を暗くするとよりはっきりわかる。



暗くして撮影





結果と考察

ここで、結果を整理し、なぜこのような結果となったかを考えよう。

結果

GFP遺伝子導入酵母は、蛍光を示すが、導入前の酵母は、発光を示さないはず。(写真)

考えよう!

どんな生物がGFPを持つのだろうか？

GFPはどんなところで使われている？

実験の注意

- ・プレートにカビや菌などが入らないために、クリーンベンチの中や締め切った部屋でガスバーナの火の下で無菌状態をつくり実験する。
- ・プレートを置くときに表裏をまえもって決めておく。
- ・1度使用したスポイトやスプレッダーは使用しない。
- ・培地にスプレッダーで酵母-DNA混合液を延ばすとき、均一になるように延ばす。
- ・酵母-DNA混合液を延ばしたプレートの保存場所は、湿気の少ないところに置いた方がよい。

実験後の片付け

1. プレート培地

プレート培地は、寒天培地をへら等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。沸騰したら火を止め、水分は流しに、寒天などの固形物は生ごみとして捨てる。流しに流すときは水で薄めながら流す。溶けた寒天が流しのパイプで固まると詰まることになる。

2. プラスチック器具類

台所用塩素系漂白剤などの除菌漂白剤によって殺菌処理して捨てる。10 mL程度の漂白剤を1Lの水に入れ、その容器に培地を除いたプレート、使用後のループ、スプレッダー、チューブ、スポイト類を入れる。10分以上置いた後、プラスチックごみとして捨てる。

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
- ・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
- ・遺伝子組換え食品 新しい食材の科学 日本農芸化学会編 学会出版センター
- ・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
- ・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
- ・遺伝子と夢のバイオ技術 野島博著 羊土社
- ・くらしと微生物 改訂版 村尾澤夫・藤井ミチ子・荒井基夫共著 培風館
- ・生物工学実験書 改訂版 日本生物工学会編 培風館
- ・生化学の夜明け 醗酵の謎を追って 丸山工作著 中公新書
- ・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 学会出版センター
- ・お酒のはなし 酒はいきもの 日本農芸化学会編 学会出版センター
- ・DNA農業 岡田吉美著 共立出版
- ・日本科学の先駆者高峰讓吉 山嶋哲盛著 岩波ジュニア新書
- ・朝日新聞夕刊 2008年10月9日
- ・朝日新聞日刊 2008年10月9日

謝辞

本キットは山口大学医学系研究科応用分子生命科学専攻の鈴木絢子さん，井手政充君，福永知晃君をはじめとする大学院生，工学部応用化学科の学生，山口県立宇部高等学校の生徒の力添えにより完成しました。深く感謝いたします。

2023年の本キット及びマニュアルの改訂5版では，山口大学大学院創成科学研究科化学系専攻の山下真穂さんと垂井修君の力添えにより，パン酵母を用いたより明るく光るGFPキットが完成しました。深く感謝いたします。

パン酵母とGFPを利用した組換えDNA実験キット

2024年7月31日 改訂6版

著者 赤田倫治
星田尚司

連絡先

山口大学大学院医学系研究科応用分子生命科学専攻
山口県宇部市常盤台2-16-1
TEL: 0836-85-9292
E-mail: rinji@yamaguchi-u.ac.jp
<http://genetic.eng.yamaguchi-u.ac.jp>