

（はじめに）

科学実験を通して、ヒトと遺伝子の関係を考えていくこと。光るたんぱく質の遺伝子組み換え実験や身近な食べ物の遺伝子分析を体験すること。分析結果を見て討論し、遺伝子分析技術の原理と応用についての理解を深めること。を目的として、この講座に参加した。

（実験の内容）

[CTAB 法における DNA 抽出]

細胞の中の核に存在する DNA を、核を包む膜を界面活性剤で壊すことで細胞の外に取り出す。DNA は負の電荷をもち反発して集まらないため、肉眼で見ることができない。電荷による反発を少なくするため食塩を加え、DNA を集める。エタノールに溶けにくい性質を利用し、沈殿を作ることにより肉眼で見えるようになる。

[PCR]

サーマルサイクラーで遺伝子を増幅させる。反応サイクルは次のようになる。

1.熱変性（二本鎖→一本鎖）2.アニーリング（プライマーの結合）3.伸長反応
1~3 を繰り返す（20~40 サイクル） 増える割合は1 サイクルで2 倍になる。

[遺伝子組み換え実験]

もとの物質から DNA を取り出す。DNA をはさみ（制限酵素）で切る。のり（DNA リガーゼ）でつなげる。もとの物質に戻す。

（CTAB 法による DNA 抽出）

- ① 野菜を細かくする
- ② CTAB 抽出液を 600 μ l 入れ、静かに転倒混和する。
- ③ 遠心する。
- ④ 上清 350 μ l を PCI が入ったチューブ（A）に入れ、静かに転倒混和する。
- ⑤ 遠心して上層 150 μ l を新しいチューブ（B）に入れる。
- ⑥ イソプロピルアルコール 150 μ l をチューブ（B）に加える。
- ⑦ 静かに転倒混和する。
- ⑧ 遠心にかけて、上清を捨てる。
- ⑨ 70%エタノールを 1000 μ l 加え、優しく転倒混和する。
- ⑩ 遠心にかけて、上清を捨てる。
- ⑪ チューブのキャップを開けたまま、逆さにして風乾させる。

実験に使用した器具

- ・マイクロピペット…①
- ・チューブ…②
- ・ボルテックスミキサー…③
- ・冷却高速遠心機…④
- ・マイクロ遠心機（卓上）…⑤

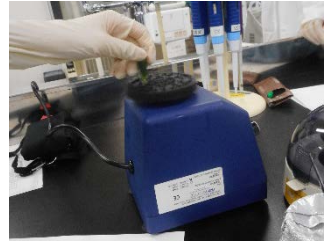
①



②



③



④



⑤



実験に使用した試薬

- ・抽出緩衝液（CTAB 抽出液）
…滅菌水で調整 CTAB…1%

Tris-HCl (pH8.0) …100mM

NaCl…1.4M

EDTA…20mM

- ・フェノールクロロホルム（PCI）・イソプロピルアルコール（イソプロパノール）
- ・70%エタノール・TE 溶液（Tris/EDTA 溶液）

（PCR）

- ① 1人2本の試料にそれぞれ異なるプライマー1 μ lずつを加える。
- ② 2つの試料に抽出液1 μ lずつ加える。
- ③ サーマルサイクラーにセットする。

実験に使用した器具

- ・マイクロピペット・チューブ・卓上遠心機・サーマルサイクラー…⑥

実験に使用した試薬

- ・プライマー

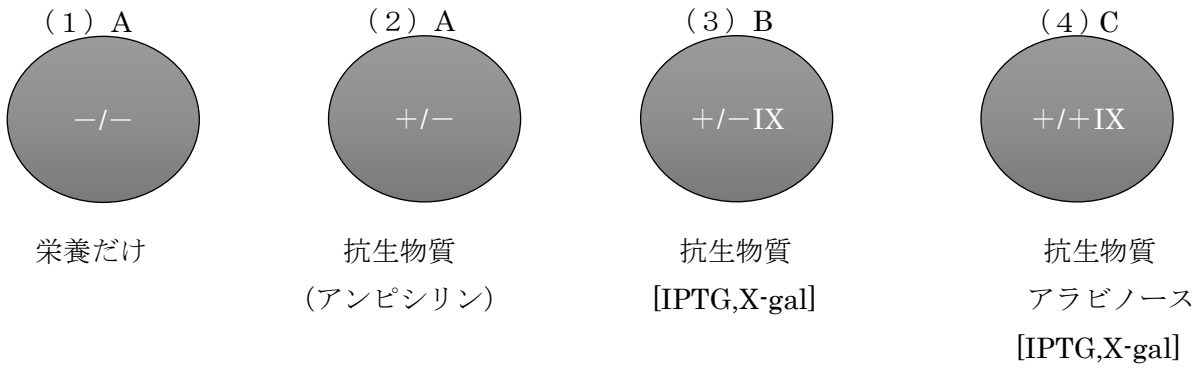
⑥



遺伝子組み換え実験

- ① 10 μ lのコンピテントセル（遺伝子導入用大腸菌 JM109）が入ったマイクロチューブ3本（以下より、ABCと区別する）を氷で冷やしておく。
- ② Bに pUC19 という DNA を 2 μ l加え、少しタッピングをして攪拌し、素早く氷の中に戻す。
- ③ Cに pGLO という DNA を 5 μ l加え、タッピングをして氷の中に戻す。
- ④ ループで培地から大腸菌を取り、ABCそれぞれのチューブに加え、氷中で保存する。
- ⑤ 42°Cの湯で60秒間温め、ヒートショックをかけ、素早く氷の中に戻す。
- ⑥ SOC 培地（37°C）を 100 μ l加える。
- ⑦ 37°Cで30分間保温（インキュベート）する。
- ⑧ 4つの培地にコーンラージ棒でABCを50 μ lとって浸透させる。A→シャーレ（1）（2）、B→シャーレ（3）、C→シャーレ（4）に入れる。
- ⑨ 37°Cで一晩保温する。

〈培地〉



実験に使用した器具

- ・マイクロピペット・チューブ・卓上遠心機・シャーレ・ループ・コーンラージ棒

実験に使用した試薬

- ・コンピテントセル (遺伝子導入用大腸菌)

(実験の結果)

CTAB 法による DNA 抽出

電気泳動実験によりサンプル内の DNA の有無を調べる。

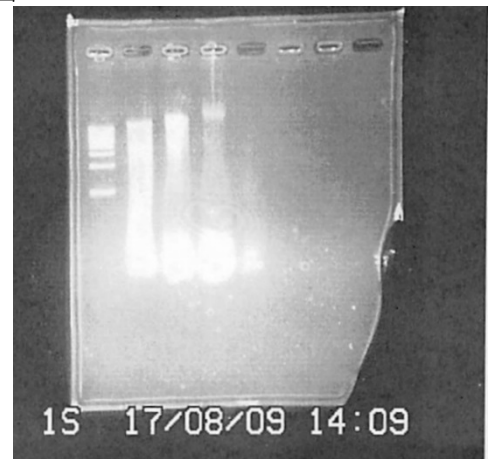
サンプル 5 μ l と GRR 5 μ l を混和させ、電気泳動装置のウェルに流し込む。

図 1

- ① マーカー ②~⑤ DNA 抽出結果

※図 1 の結果より、②~⑤のサンプルには DNA が含まれていたことが分かる。

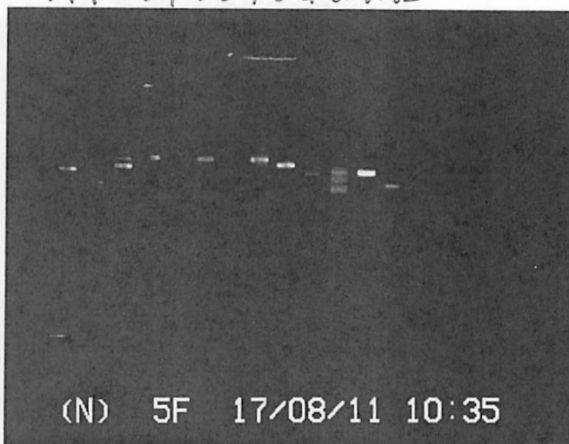
図 1 ① ② ③ ④ ⑤



PCR

電気泳動実験により、DNA が実験に使用できる量まで増えたかどうかを調べる。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



↑ 図 2 (加藤) 10、11、

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



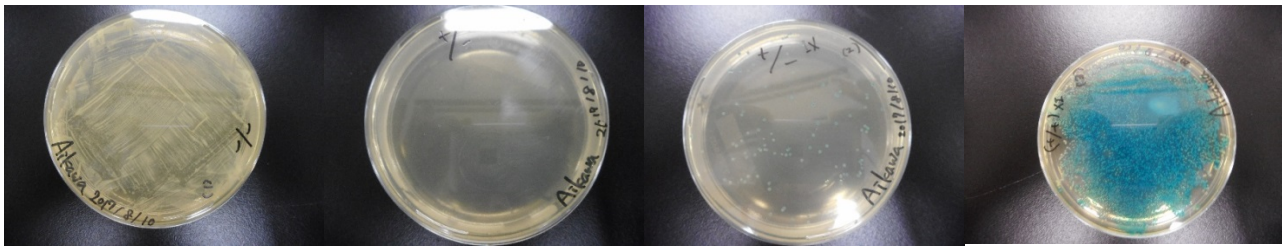
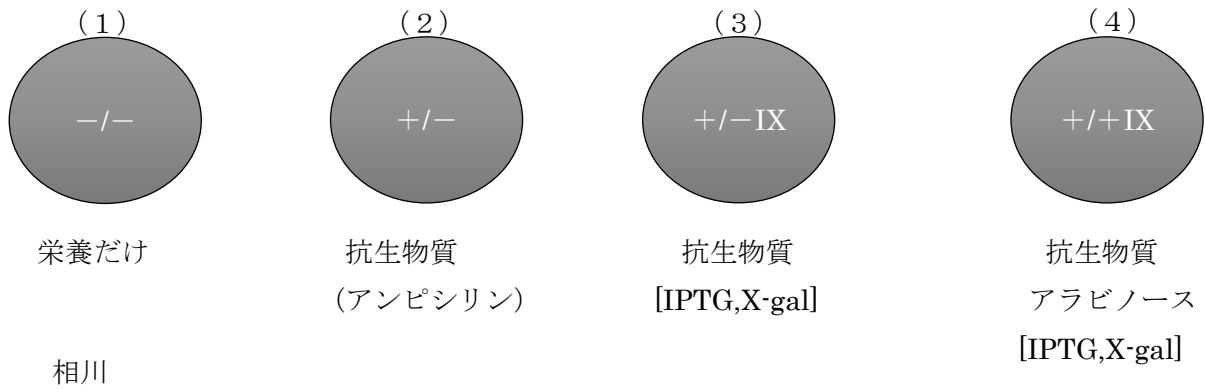
↑ 図 3 (相川) 10、11、12

加藤 10 A05 11 A07 12 キャベツ

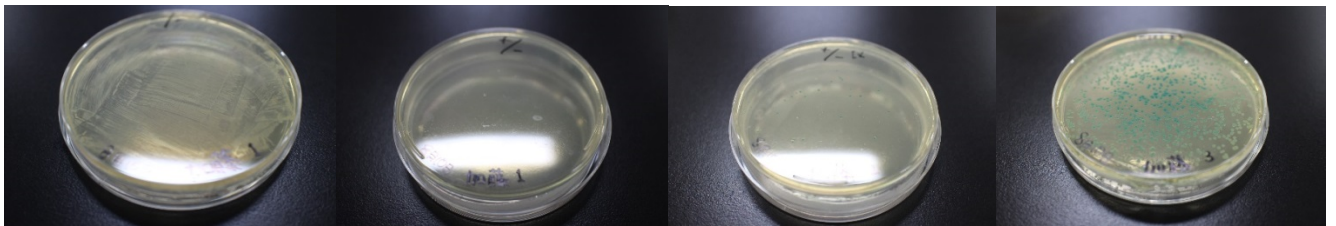
相川 10 チンゲンサイ 11 A03 12 A09

※図 2 10、11 図 3 11、12 より、DNA の量が増えたことが分かった。

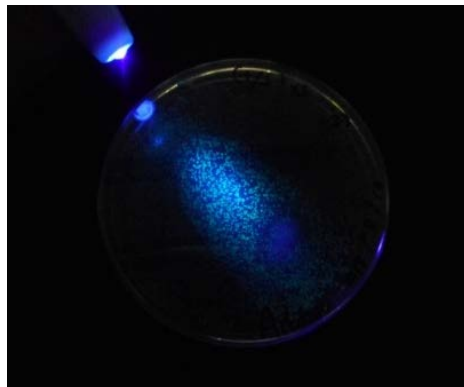
遺伝子組み換え実験



加藤



(4) にブラックライトにあてたとき



(考察)

CTAB 法による DNA 抽出

DNA を抽出することができたが、泳動結果 (図 1) の写真から DNA の長さを調べることはできなかった。理由として、何らかの衝撃で DNA が破砕されてしまったこと、不純物が混入してしまったことが挙げられる。前者は、静かに混和させるべきところをボルテックスミキサーによって混和したこと、激しく振って混和してしまったことが原因だと思われる。

PCR

DNA が増幅したことが確認できた。しかし、実験結果の図 2, 3 のバンドが単一ではなかった。理由は、CTAB 法と同様に不純物が混入してしまったことだと思われる。

遺伝子組み換え実験

結果より、遺伝子が組み換えられ別の性質が現れた。シャーレ (1)、(2) より、遺伝子組み換え前では抗生物質が含まれた培地には大腸菌が繁殖できないことが確認できる。遺伝子を組み換えた (3)、(4) では、抗生物質を含んだ培地でも繁殖した。このことから、抗体を持った遺伝子を導入したことが分かった。加えて、(3) には青色、(4) には緑色で発光する大腸菌が繁殖した。よって、(3) に導入した pUC19、(4) に導入した pGLO には抗生物質(アンピシリン)に対する耐性をもち、pUC19 は X-gal に反応し青色になる酵素を、pGLO はアラビノースに反応し緑色に光る遺伝子をもっていることがわかる。

感想

今回初めてこのような実験に参加することができて、とても楽しかった。特に、遺伝子組み換え実験では、導入する遺伝子によって性質が変わるのを実際に見ることができ、興味深かった。さらに、レポートを書くにあたって、実験への理解を深めることができたので、この実験講座によって得られたものを大きくすることができた。この講座に参加した経験をいろいろな場面で活かしていければと思う。