

パン酵母を利用した 組換えDNA実験キット



マニュアル

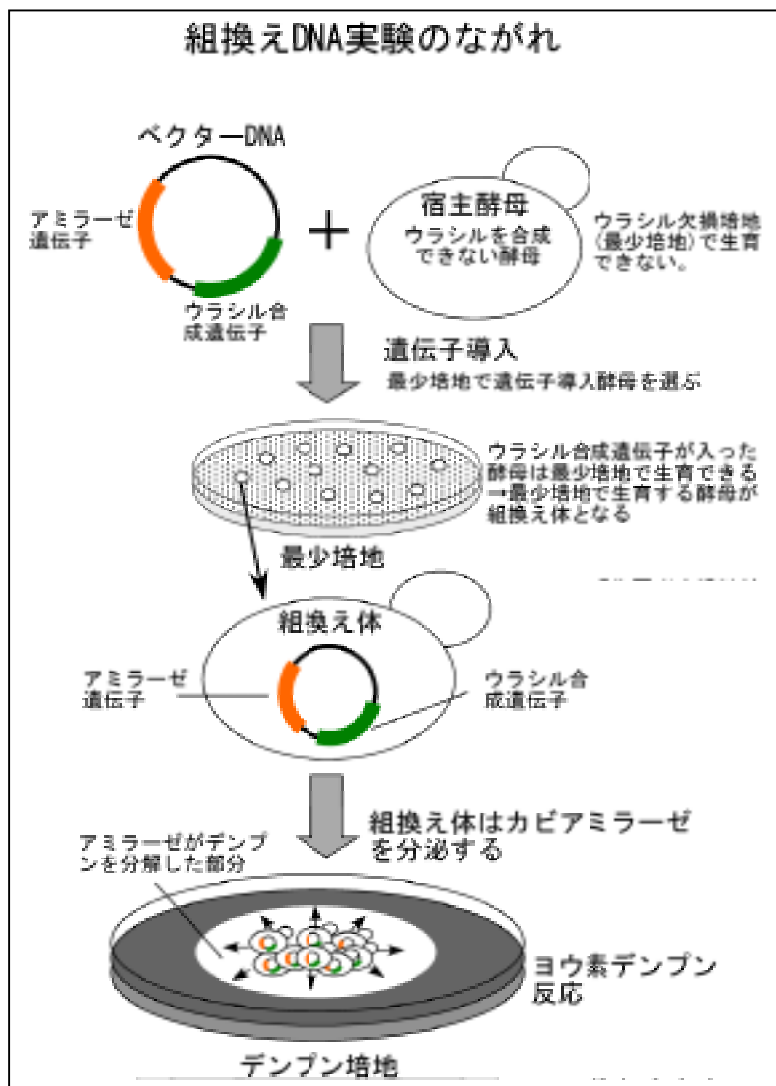
山口大学

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。

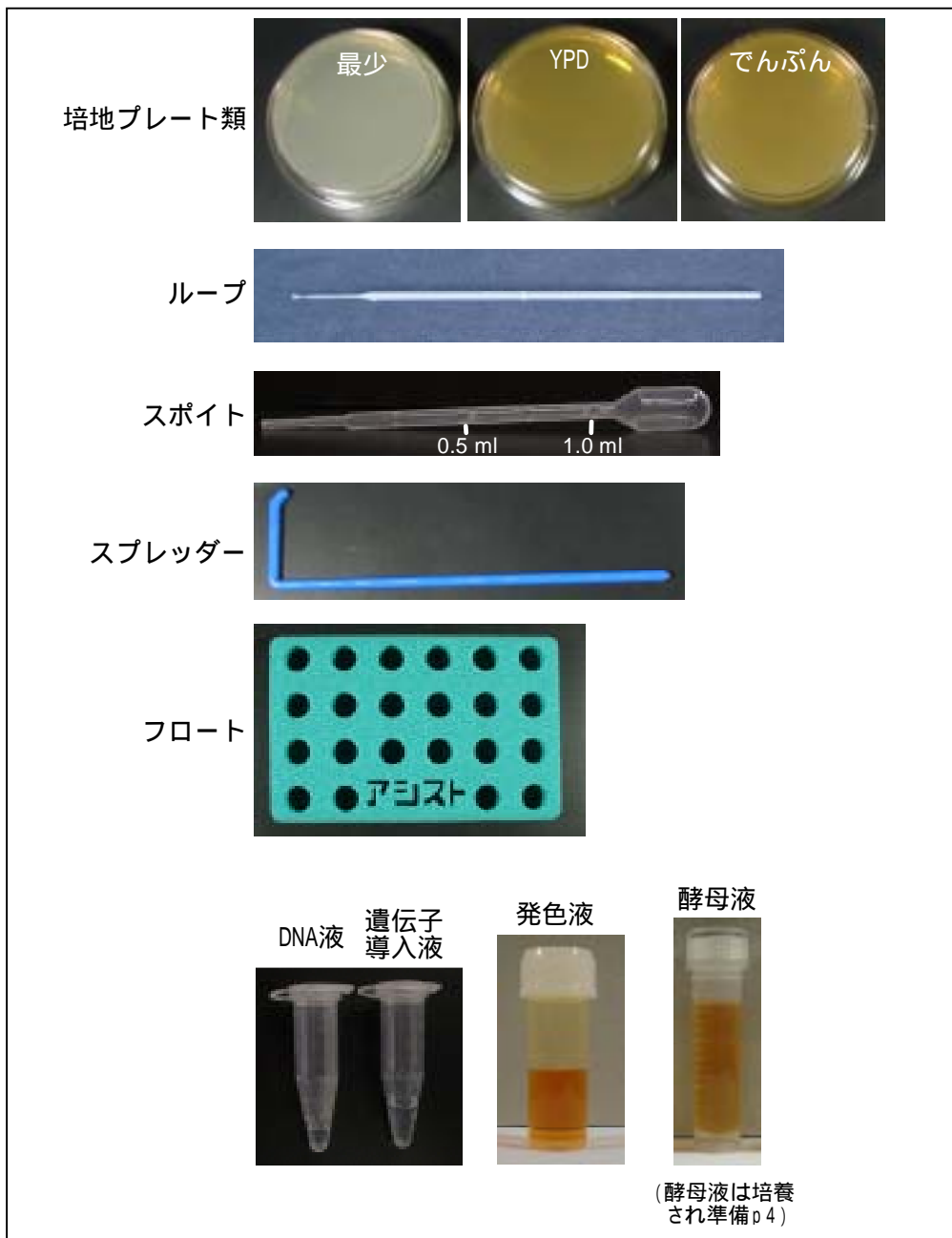
- ・ 窓や扉は閉じておく
- ・ 飲食、食品の保存、喫煙の禁止
- ・ 実験終了後に手を洗う
- ・ 実験終了後に組換え体、実験器具を確実に滅菌
- ・ 実験室の整理整頓

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。



組換えDNA実験

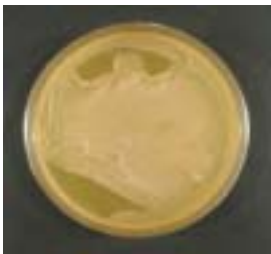
実験中の注意

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。

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。

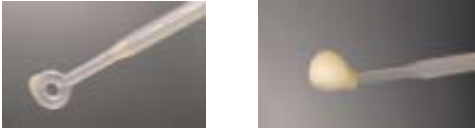
・用意するもの（実験室に一つ）

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。



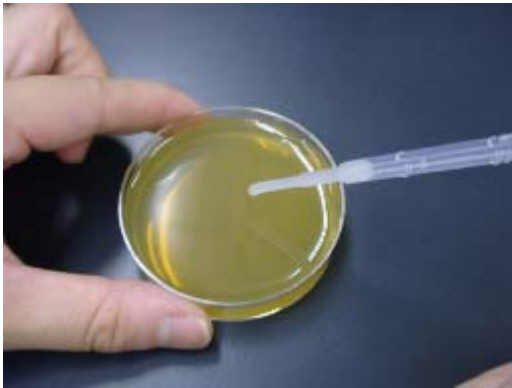
3. スポイトを用いて「DNA」チューブの中に入っているDNA溶液すべてを酵母菌の入った遺伝子導入液に入れる。

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(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℃の湯浴中に20分間置く。

6. 20分後、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。

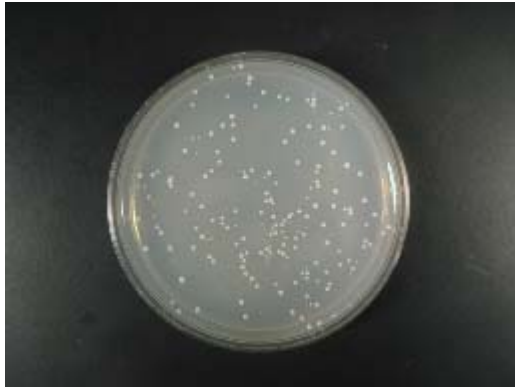
フタを長い間開けないことも重要。空気中の微生物が混入する。



8. フタに名前を書く。

9. 室温で3～7日間置いておく。30℃であれば約2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時間め予習

アミラーゼ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2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
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）

遺伝子導入前酵母菌	1 枚
-----------	-----

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。

これらの酵母にはアミラーゼ遺伝子も同時に導入されている。アミラーゼ遺伝子を持たない酵母菌が新たにアミラーゼを作れるようになり、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作れるようになったかどうかを調べる。



3時間めのアミラーゼ活性検出実験の準備

アミラーゼ活性検出のために、遺伝子導入された酵母コロニーや遺伝子導入前酵母をデンプン培地で培養する。

1. デンプン培地のウラ側にサインペンで点を2 cm以上開けて2つ書く。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(30℃程度がよい)で静置する。翌日から活性検出が可能であるが1週間でもよい。



2 cm以上の間を開けて2種の酵母を塗る（植えるともいう）。

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？

デンプンとは何？

だ液中のデンプン分解酵素アミラーゼと今回の遺伝子との関係は？

消化酵素とは何？

3時間目の予習

ヨウ素デンプン反応を調べておこう。

3 時間め実験「アミラーゼ活性の検出」

前回用意した遺伝子導入酵母を塗ったデンプン培地を使った実験

・用意するもの（1グループ分）

酵母菌を塗ったデンプン培地	1枚
スポイト	1本
発色液	1本

デンプン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。このプレートにヨウ素を反応させ、デンプンを検出する。

酵母を塗った培地のフタをあけ、2ml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垂らす(写真)。プレート全体になじませるが強く振りすぎない。



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。

結果と考察

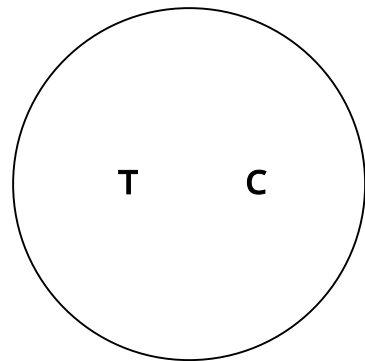
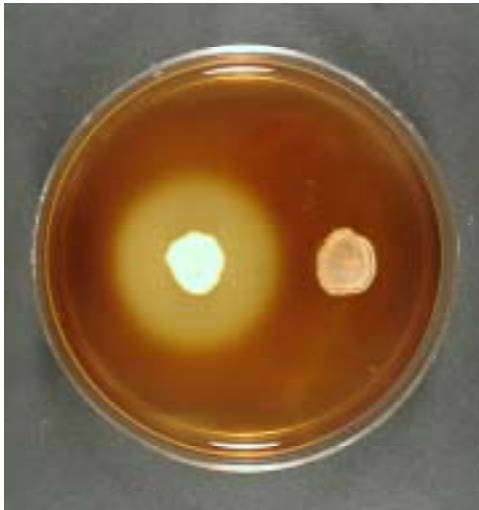
ここで、結果を整理し、なぜこのような結果となったかを考えよう。

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垂らせば色がでる。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。発色したらデジタルカメラで写真を撮っておくとよい。

結果

アミラーゼ遺伝子導入酵母「T」の周りは透明となるが、「C」の導入前酵母株の周りには透明帯がないはず(写真)。この透明帯をハロと呼ぶ。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の周りにヨウ素液(発色液)をふりかけると酵母菌の周囲にはデンプン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。



酵母菌がもともと持っていなかったアミラーゼをアミラーゼ遺伝子を導入することで持つことができるようになった。つまり、遺伝子工学的な酵母菌の改良ができたことになる。

考えよう！

だ液にアミラーゼがないとどうなる？

胃腸薬にアミラーゼが入っている。どんな生物のアミラーゼ？

アミラーゼは胃腸薬以外にどんなところで使われている？

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 -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

謝辞

本マニュアルは山口大学教育研究後援財団の助成により印刷されました。また、本キットは山口大学工学部応用化学工学科の学生および研究室大学院生の力添えにより完成しました。深く感謝いたします。

パン酵母を利用した組換えDNA実験キット

2006年8月31日 初版

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 , FAX: 0836-85-9201
E-mail: rinji@yamaguchi-u.ac.jp
<http://genetic.eng.yamaguchi-u.ac.jp>