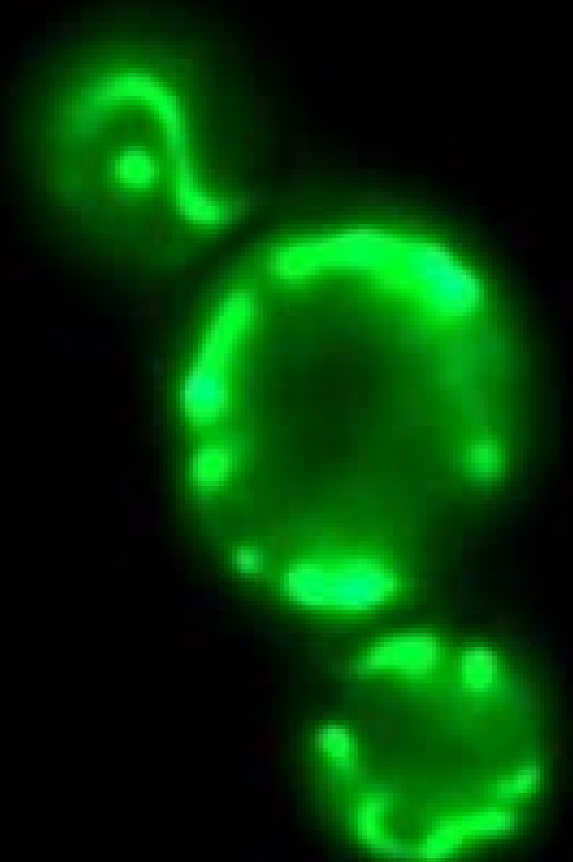


高校生のための 蛍光遺伝子導入キットの開発



1930 山口県立宇部高等学校

鈴木 芽依 善甫 英里子 田中 亮介 内藤 容子

中谷 隆寛 中村 萌 山本 理恵

動機

- 遺伝子導入は難しい作業が必要・・・ というイメージ



高校の生物実験のレベルで、簡単に
遺伝子導入実験を体験できないだろうか？

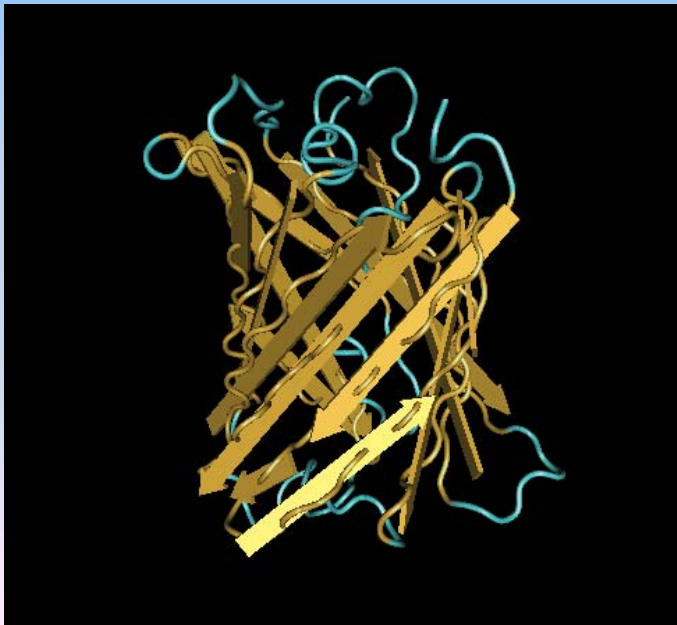
- 遺伝子導入できたかどうか一目で確認する



GFP遺伝子を使用
(山口大学が開発したキットを応用)

GFPについて

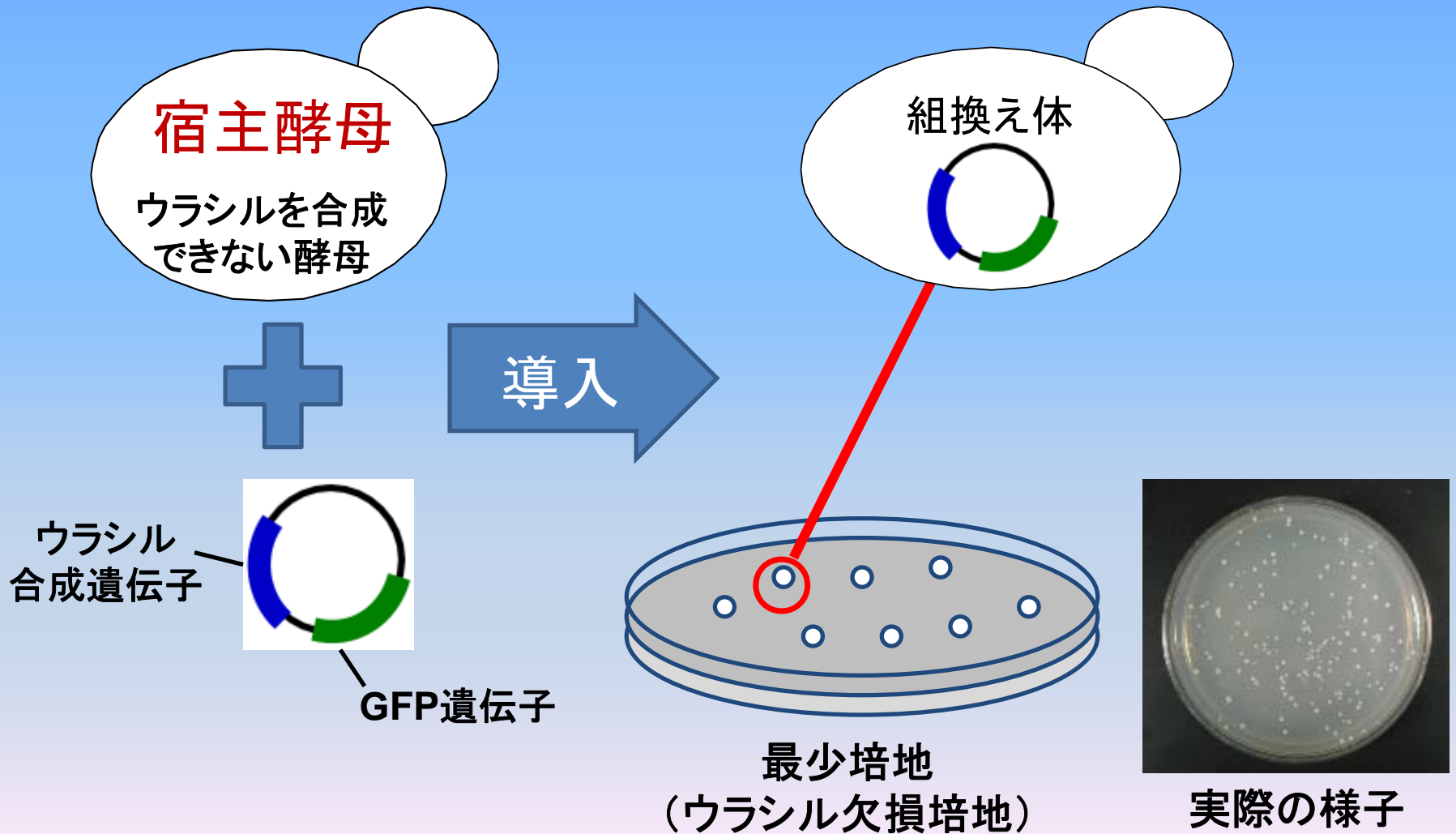
- 青い光を当てると分子が緑色の蛍光を発する
- 現在**医療分野**や**生物学分野**で用いられている



GFPの構造

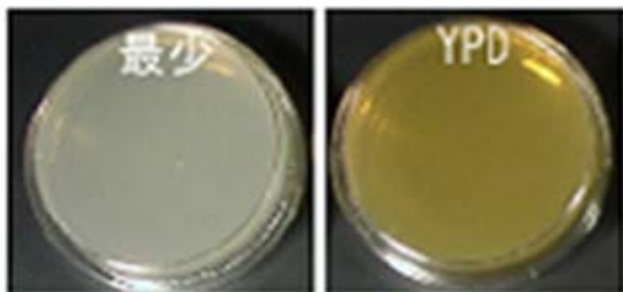
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>より引用)

導入の仕組み

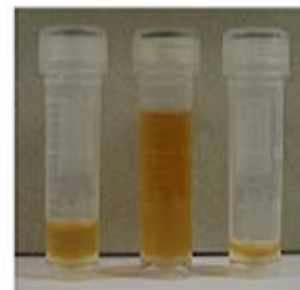


開発したキットの実験材料

培地



酵母菌液



スポイト



ループ



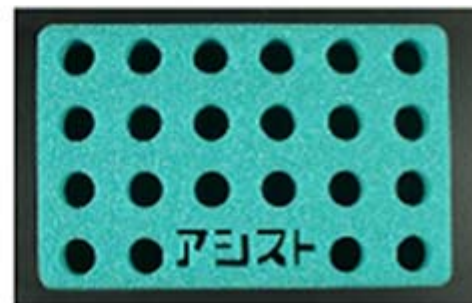
スプレッター



アクリル板



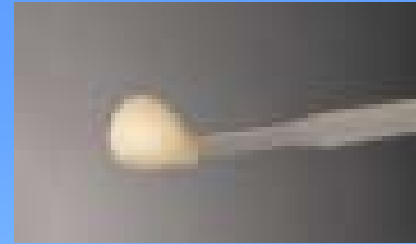
ムードランプ



フロート

実験の手順

1. YPDプレートに生育している酵母菌をループでかきとり遺伝子導入液にいれる
2. DNA溶液を(1)に入れる
3. (2)を42°Cの湯浴中に20分間入れる
4. 20分後最少培地にまき3~7日間置いておく



ループで酵母をかきとる様子



遺伝子導入液に入れている様子

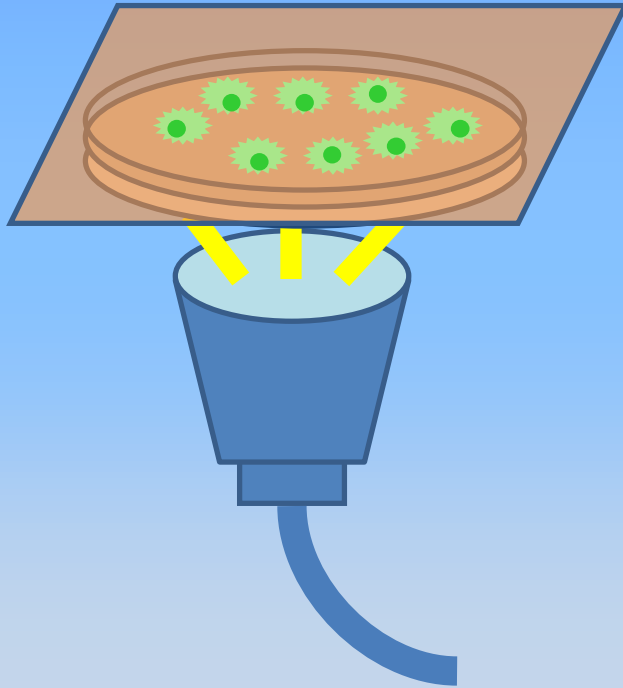


DNA溶液を入れた様子

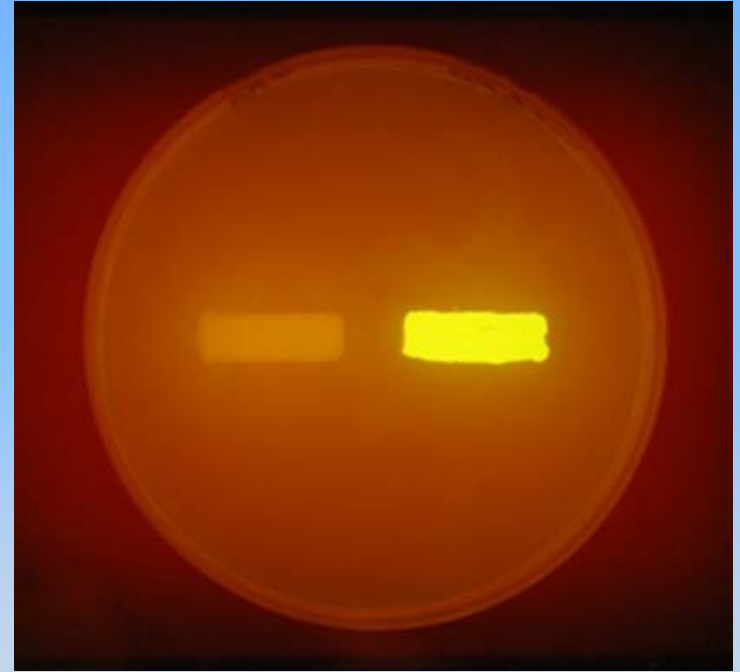


最少培地に酵母-DNA混合液をまいている様子

観察の様子



ムードランプを下から当て、プレートの上に
オレンジ色のアクリル板をかぶせて観察して
いる様子

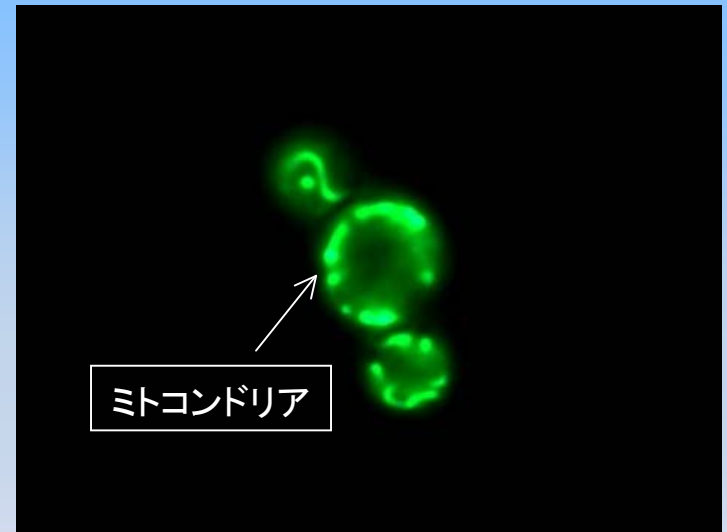


実際の様子

左:コントロール 右:GFP導入したもの

結果

高校生でも簡単にGFPを導入することができた



GFPを導入した酵母菌の画像 左:光学顕微鏡 右:蛍光顕微鏡

開発したキットの特徴

- 特別な実験機器を必要としない
- 培地の保存が容易
- 身近な酵母菌を利用するため

安全で親しみやすい

- キットを用いて応用が可能

BIO-RAD社のキットと比較

	開発したキット	BIO-RAD社のキット
宿主	酵母菌	大腸菌
マーカー遺伝子	ウラシル合成 遺伝子	アンピシリン耐性遺伝子
培地	最少培地	LB/Amp培地
培養日数	3～7日	16～20時間後

実験手順の比較

BIO-RAD社

1. 培地を作る
2. 大腸菌の入った瓶に形質転換溶液を入れる
3. 軽く揺らし5分間放置
4. それをスタープレートにまく
5. 37°Cで16~20時間培養する
6. プラスミドの入った瓶に形質転換溶液を入れる
7. 使用するまで冷蔵保存する
8. +DNAチューブと書いたマイクロチューブに形質転換溶液を入れる
9. そのチューブを氷上に置く
10. スタープレートからコロニーを2~3つすくい取り、それぞれのチューブに大腸菌を入れ、すぐに氷上に置く
11. 新しいループの先の輪にプラスミド溶液の膜を張らせ、その状態で+DNAチューブだけに入れる
11. それぞれのチューブを氷上に10分間置く
13. その後42°Cの湯浴中に50秒つけ、すぐに氷上に戻し2分間置く
14. それぞれのチューブにLB培地溶液を入れ10分間室温で放置する
15. プレートにチューブの中の溶液をまく
 - LB培地 ⇒ -DNA溶液
 - LB/Amp培地 ⇒ +DNA溶液
 - LB/Amp培地 ⇒ -DNA溶液
 - LB/Amp/ARA培地 ⇒ +DNA溶液

私たちの開発したキット

1. 酵母菌をYPDプレートに生育させる
2. YPDプレートに生育している酵母菌をループでかきとり遺伝子導入液にいれる
3. DNA溶液を(1)にいれる
4. (2)を42°Cの湯浴中に20分間入れる
5. 20分後LB培地にまき3~7日間置いておく

15工程

5工程

BIO-RAD社のキットの メリット・デメリット

〈メリット〉

- 成長が速い
- GFPの発現の調節ができる

〈デメリット〉

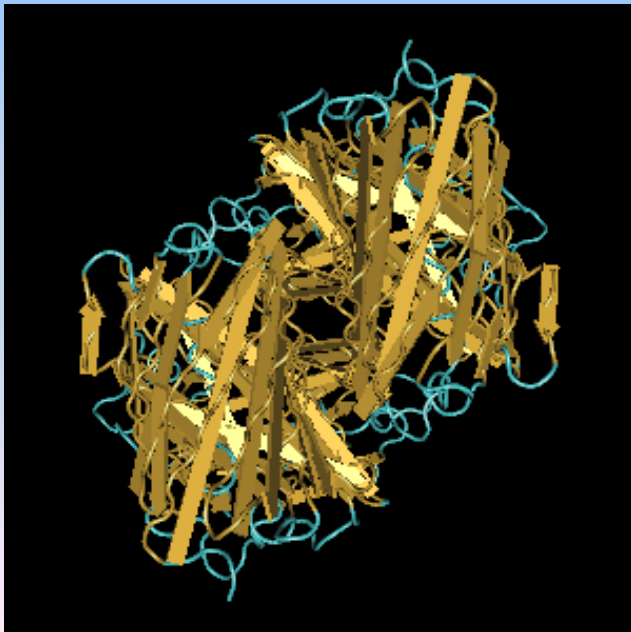
- 導入の仕組みが難しい
- 時間の制限がある
- 紫外線を使う

開発キットの応用

1. その他の蛍光タンパク質を使っても、同様の結果が得られるかどうか
2. 生物学分野・医療分野などに利用できるかどうか
例 GFPとRFPの同時発現の実験

RFPについて

- イソギンチャク・サンゴなどから得られる赤色蛍光タンパク質
- GFPの緑色の光より深い所まで到達する



RFPの構造

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>より引用)

結果 I

ムードランプ 亚克力板	青	白	黄	赤	緑
パープル	×	×	○	×	○
スカイブルー	×	×	×	×	×
サマーグリーン	×	×	×	×	×
レモン	×	×	×	×	×
オレンジ	○	×	×	×	○
レッド	○	×	×	×	◎

- ◎: 強い蛍光がみられたもの
- : 蛍光がみられたもの
- ×: 蛍光がみられなかったもの



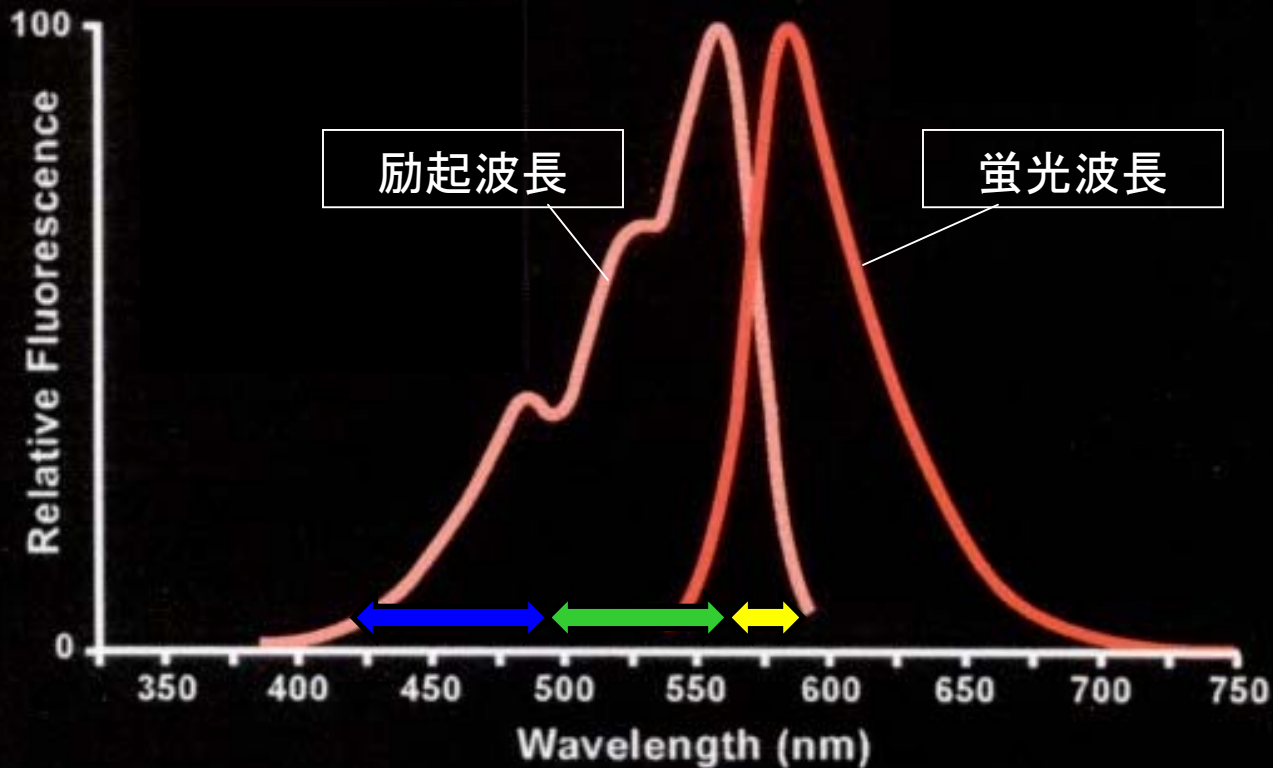
通常



緑×レッド

(ムードランプ×亚克力板)

結果Ⅱ



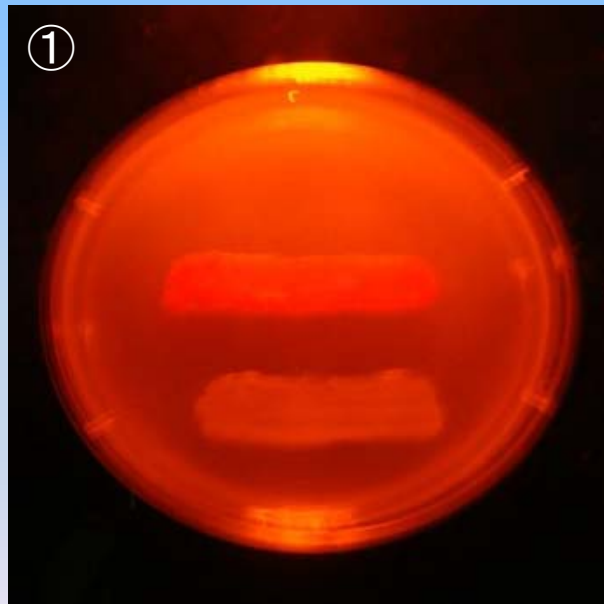
Fluorescent proteins
as tools to aid protein
production
(Author: Su Wei) より
引用

励起波長は、青色(435~490nm)や緑色(490~580nm)、黄色(580~595nm)の波長に近い

考察

①励起波長ではない ※赤色の波長610~750nm

②透過現象



赤×オレンジ

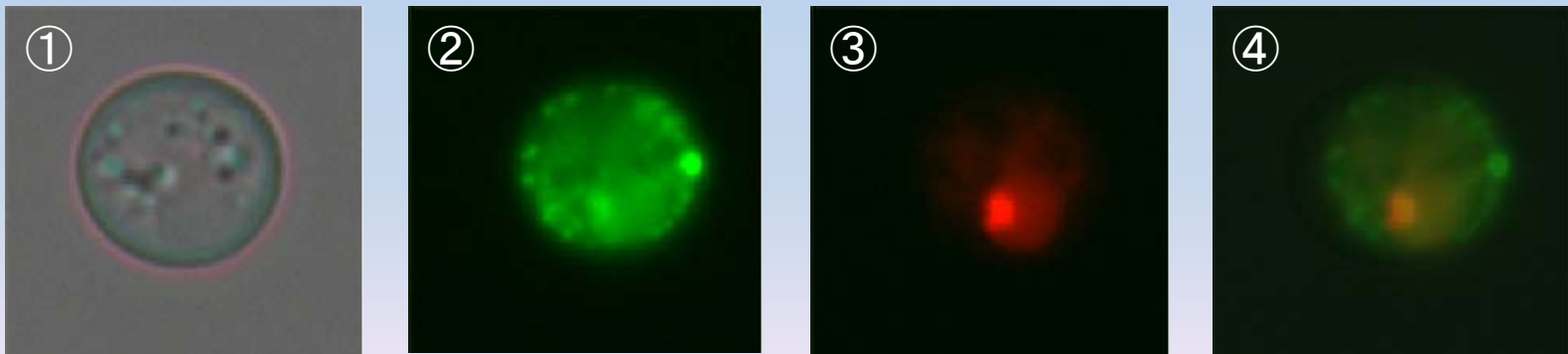


青×レモン

(ムードランプ×アクリル板)

GFPとRFPの同時発現

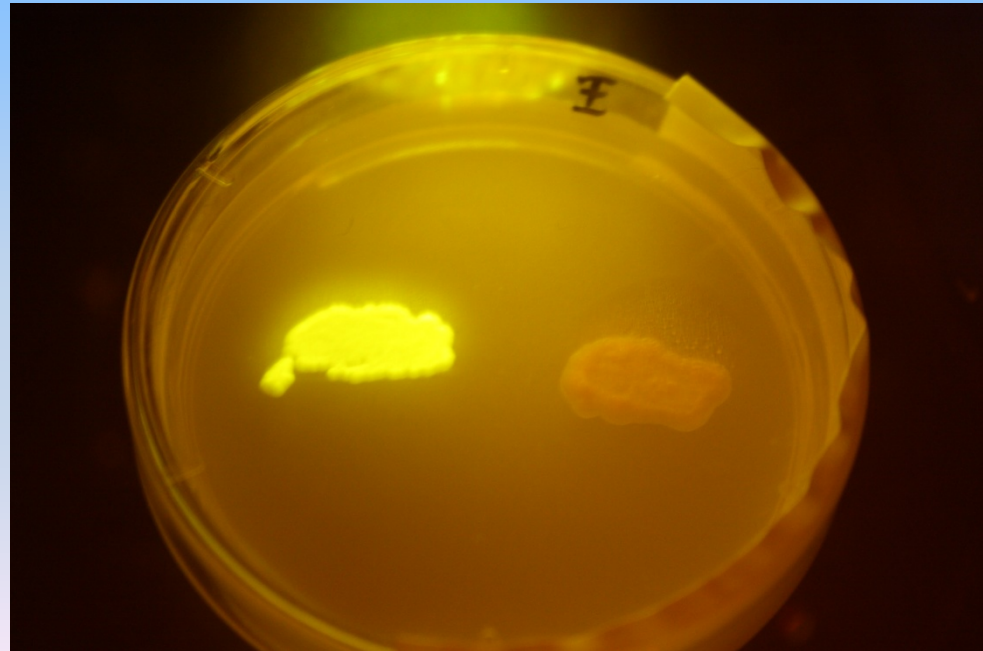
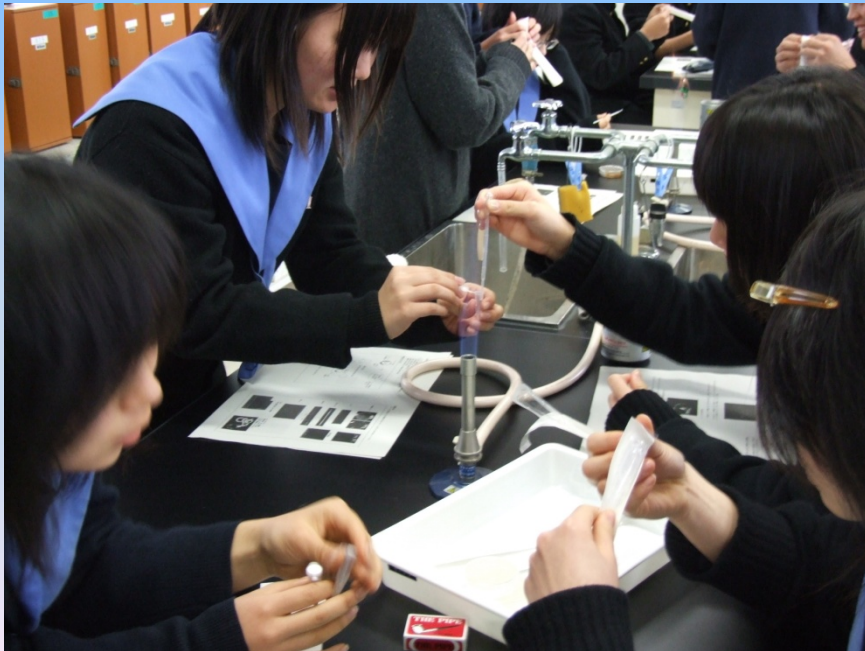
- 開発キットと同じ手順
- 染色体にRFP遺伝子が組み込まれている酵母菌にGFP遺伝子を導入する
- GFP⇒ミトコンドリア



①: 光学顕微鏡で観察したもの ②③④: 蛍光顕微鏡で観察したもの

実際に・・・

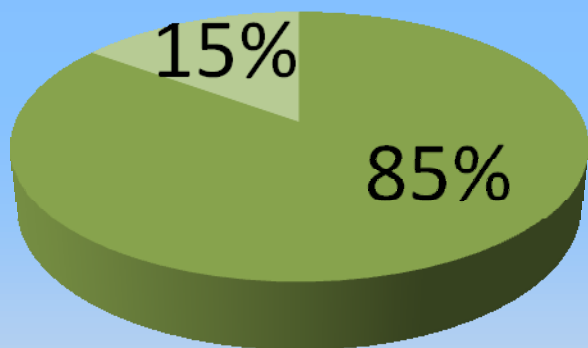
理数科2年の生物選択者を対象に開発した
キットの実験を行った



アンケート結果

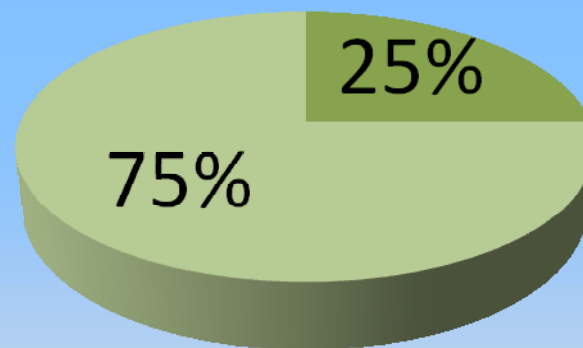
実験操作は簡単だったか？

■ YES ■ NO



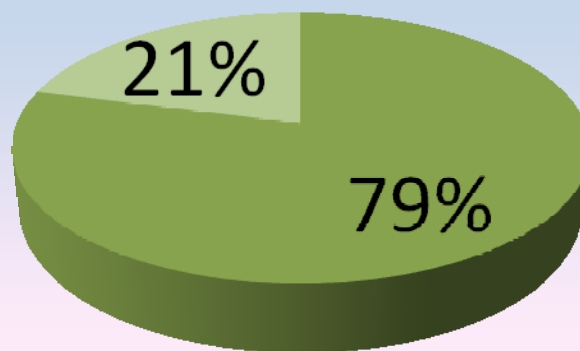
GFPを知っていたか？

■ YES ■ NO



GFPに興味を持ったか？

■ YES ■ NO



まとめ

- 蛍光遺伝子を用いた遺伝子導入キットの開発に成功した
- 他の蛍光遺伝子でも、同様の結果が得られた
- GFPとRFPの同時発現に成功した
- 最先端の研究に用いられている技術を簡単に体験できる
- このキットを全国の高校生に広めていきたい

キット開発を通じての感想

- 今回の研究で、遺伝子に興味を持てるようになった
- 遺伝子導入の仕組みの多くが解明されていないことに驚いた
- 解明されていない遺伝子導入の仕組みを、自分たちで一つでも解明したい

謝辞

本研究をするにあたって山口大学工学部
赤田倫治教授や多くの大学院生に
ご指導をいただきました。

本当にありがとうございました。

ご清聴ありがとうございました