

山口大学宇部高講義

# DNAと 遺伝子組換え



山口大学工学部生物機能研究室

# DNA を取り出してみる実験

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 を大腸菌から取り出します。さて、どんなものなののでしょうか。

## 大腸菌からプラスミド DNA の精製と電気泳動による確認

### 1-1. プラスミド DNA の精製

プラスミドを持つ大腸菌の培養液

↓

1.5 ml のマイクロチューブに取る。

↓

遠心 12000rpm、30 秒。

↓

上清を捨てて、沈殿（大腸菌細胞）を残す。

↓ 100  $\mu$ l のリシス液を入れる。

完全に懸濁する。

↓ 200  $\mu$ l のアルカリ-SDS 液を加える。

懸濁。vortex。大腸菌が溶けるはず。観察せよ。

↓ 150  $\mu$ l の 3 M 酢酸ナトリウム液を入れる。

懸濁。vortex。白い沈殿が生じるはず。観察せよ。

↓

遠心。12000rpm、3 分

↓

上清を別のチューブに採る。約 450  $\mu$ l ある。

↓ 1 ml の 99%エタノールを加える。

よく混ぜる。沈殿ある？

↓

遠心。12000rpm、3 分

白い沈殿が見えるはず！

これが DNA (RNA も含む) だ。

↓

上清を完全に捨てて、乾燥させる。

↓ 50  $\mu$ l の TE 液を入れる。

これがプラスミド DNA 溶液となる。



## 1-2. 電気泳動によるプラスミド DNA の確認

1) 寒天ゲルを作る。

容器に寒天 0.8 g を入れ、100 ml の TAE 液を加える。電子レンジで寒天を完全に溶かし、やや冷えてからゲル作成皿に注ぐ。穴をあけるためのコームをセットし、固まるのを待つ。

2) DNA 溶液の調整 2 本用意

<u>No. 1</u>		<u>No. 2</u>	
DNA 溶液	10 $\mu$ l	DNA 溶液	10 $\mu$ l
<u>BPB 液</u>	<u>2 <math>\mu</math>l</u>	BPB 液	2 $\mu$ l
計	12 $\mu$ l	<u>RNA 分解酵素</u>	<u>1 <math>\mu</math>l</u>
		計	13 $\mu$ l

3) ゲルを電気泳動装置にセットして穴にそっと DNA/BPB 溶液を流し込む。

100 Volt で約 30 分間流す。

4) UV ランプの上にゲルを置き、観察する。UV を直接目で見ないこと。

さて、何が見えた？

### 【注意】

電気泳動で使うエチジウムブロマイドは、発癌物質です。扱いには注意して下さい。



### 【実験材料】

#### DNA と菌株

◇プラスミド DNA : pRS316 (酵母の *URA3* 遺伝子を持つ, *CEN/ARS*, *Amp<sup>r</sup> ori*, *URA3*)。

◇大腸菌 : *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  株 遺伝子操作の主役は、バクテリアの大腸菌である。大腸菌は、1 日で大量に増えてくれる。遺伝子 (ヒトのも) は、通常大腸菌を借りて増幅され、解析される。

#### 大腸菌培養液

◇Plasmid Broth 液体培地 ; 1.2%ペプトン、2.4%酵母エキス、0.4%(v/v)グリセロール、0.1Mリン酸カリウムバッファーpH7.6。

#### プラスミド DNA 精製用試薬

◇リシス液 ; 0.9%グルコース, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH8.0, ◇アルカリ-SDS 液 ; 0.2 M NaOH, 1% SDS, ◇3M酢酸ナトリウム液 pH4.8, ◇TE 液 ; 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH7.5. ◇99%エタノール

#### 電気泳動用試薬

◇TAE 液 ; 40 mM Tris-acetate, 10 mM EDTA pH8.0. ◇エチジウムブロマイド溶液 ; 5 mg/ml ◇BPB 液 ; 40% グリセロール、0.25% bromophenol blue、0.25% xylene cyanol FF

# DNA はすごく長いひも

私たちの体は小さな部屋が集まってできています。ヒトは60兆個の部屋でできていて、それぞれに部屋にDNAの設計図が置かれています。

顕微鏡でしかみえない小さな部屋には1mもの長さのDNAが入っています(くもの糸を想像するとその太さ0.2mmでは100kmの長さとなるような糸です)。

# 文字は A・T・G・C

このひもにはATGCの文字が書かれています。ヒトでは30億文字あります。既に人類はこのすべてを解読しています。

# 暗号解読もできる。

みなさんの血液型遺伝子の暗号を解読してみましょう。

実はABOは大変似た遺伝子でほんの少ししか違いません。比較するとおもしろい。実はO型遺伝子はA型遺伝子と1文字しか違わないのに壊れています。解読して比較するとわかるよ。

# 体験 DNA の暗号解読

- 1) 暗号は 3 文字で一つ。
- 2) 解読されると 20 種類のパーツ(アミノ酸)のどれかになる。  
(ATG は M となる)
- 3) 解読終了暗号が 3 種ある (STOP)

## 遺伝暗号解読表

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

## A 型遺伝子配列 暗号表で解読してみよう。

ATG GCC GAG GTG TTG CGG ACG CTG GCC GGA AAA CCA AAA TGC CAC GCA CTT CGA CCT ATG  
ATC CTT TTC CTA ATA ATG CTT GTC TTG GTC TTT GGT TAC GGG GTC CTA AGC CCC AGA  
AGT CTA ATG CCA GGA AGC CTG GAA CGG GGG TTC TGC ATG GCT GTT AGG GAA CCT GAC CAT  
CTG CAG CGC GTC TCG TTG CCA AGG ATG GTC TAC CCC CAG CCA AAG GTG CTG ACA CCG TGT  
AGG AAG GAT GTC CTC GTG **GTG** ACC CCT TGG CTG GCT CCC ATT GTC TGG GAG GGC ACA TTC  
AAC ATC GAC ATC CTC AAC GAG CAG TTC AGG CTC CAG AAC ACC ACC ATT GGG TTA ACT GTG  
TTT GCC ATC AAG AAA TAC GTG GCT TTC CTG AAG CTG TTC CTG GAG ACG GCG GAG AAG CAC  
TTC ATG GTG GGC CAC CGT GTC CAC TAC TAT GTC TTC ACC GAC CAG CCG GCC GCG GTG CCC  
CGC GTG ACG CTG GGG ACC GGT CGG CAG CTG TCA GTG CTG GAG GTG CGC GCC TAC AAG CGC  
TGG CAG GAC GTG TCC ATG CGC CGC ATG GAG ATG ATC AGT GAC TTC TGC GAG CGG CGC TTC  
CTC AGC GAG GTG GAT TAC CTG GTG TGC GTG GAC GTG GAC ATG GAG TTC CGC GAC CAC GTG  
GGC GTG GAG ATC CTG ACT CCG CTG TTC GGC ACC CTG CAC CCC GGC TTC TAC GGA AGC AGC  
CGG GAG GCC TTC ACC TAC GAG CGC CGG CCC CAG TCC CAG GCC TAC ATC CCC AAG GAC GAG  
GGC GAT TTC TAC TAC CTG GGG GGG TTC TTC GGG GGG TCG GTG CAA GAG GTG CAG CGG CTC  
ACC AGG GCC TGC CAC CAG GCC ATG ATG GTC GAC CAG GCC AAC GGC ATC GAG GCC GTG TGG  
CAC GAC GAG AGC CAC CTG AAC AAG TAC CTG CTG CGC CAC AAA CCC ACC AAG GTG CTC TCC  
CCC GAG TAC TTG TGG GAC CAG CAG CTG CTG GGC TGG CCC GCC GTC CTG AGG AAG CTG AGG  
TTC ACT GCG GTG CCC AAG AAC CAC CAG GCG GTC CGG AAC CCG TGA

## B 型遺伝子配列 暗号表で解読してみよう。

ATG GCC GAG GTG TTG CGG ACG CTG GCC GGA AAA CCA AAA TGC CAC GCA CTT CGA CCT ATG  
ATC CTT TTC CTA ATA ATG CTT GTC TTG GTC TTT GGT TAC GGG GTC CTA AGC CCC AGA  
AGT CTA ATG CCA GGA AGC CTG GAA CGG GGG TTC TGC ATG GCT GTT AGG GAA CCT GAC CAT  
CTG CAG CGC GTC TCG TTG CCA AGG ATG GTC TAC CCC CAG CCA AAG GTG CTG ACA CCG TGT  
AGG AAG GAT GTC CTC GTG **GTG** ACC CCT TGG CTG GCT CCC ATT GTC TGG GAG GGC ACG TTC  
AAC ATC GAC ATC CTC AAC GAG CAG TTC AGG CTC CAG AAC ACC ACC ATT GGG TTA ACT GTG  
TTT GCC ATC AAG AAA TAC GTG GCT TTC CTG AAG CTG TTC CTG GAG ACG GCG GAG AAG CAC  
TTC ATG GTG GGC CAC CGT GTC CAC TAC TAT GTC TTC ACC GAC CAG CCG GCC GCG GTG CCC  
CGC GTG ACG CTG GGG ACC GGT CGG CAG CTG TCA GTG CTG GAG GTG GGC GCC TAC AAG CGC  
TGG CAG GAC GTG TCC ATG CGC CGC ATG GAG ATG ATC AGT GAC TTC TGC GAG CGG CGC TTC  
CTC AGC GAG GTG GAT TAC CTG GTG TGC GTG GAC GTG GAC ATG GAG TTC CGC GAC CAT GTG  
GGC GTG GAG ATC CTG ACT CCG CTG TTC GGC ACC CTG CAC CCC AGC TTC TAC GGA AGC AGC  
CGG GAG GCC TTC ACC TAC GAG CGC CGG CCC CAG TCC CAG GCC TAC ATC CCC AAG GAC GAG  
GGC GAT TTC TAC TAC ATG GGG GCG TTC TTC GGG GGG TCG GTG CAA GAG GTG CAG CGG CTC  
ACC AGG GCC TGC CAC CAG GCC ATG ATG GTC GAC CAG GCC AAC GGC ATC GAG GCC GTG TGG  
CAC GAC GAG AGC CAC CTG AAC AAG TAC CTA CTG CGC CAC AAA CCC ACC AAG GTG CTC TCC  
CCC GAG TAC TTG TGG GAC CAG CAG CTG CTG GGC TGG CCC GCC GTC CTG AGG AAG CTG AGG  
TTC ACT GCG GTG CCC AAG AAC CAC CAG GCG GTC CGG AAC CCG TGA

## O 型遺伝子配列 暗号表で解読してみよう。

ATG GCC GAG GTG TTG CGG ACG CTG GCC GGA AAA CCA AAA TGC CAC GCA CTT CGA CCT ATG  
ATC CTT TTC CTA ATA ATG CTT GTC TTG GTC TTG TTT GGT TAC GGG GTC CTA AGC CCC AGA  
AGT CTA ATG CCA GGA AGC CTG GAA CGG GGG TTC TGC ATG GCT GTT AGG GAA CCT GAC CAT  
CTG CAG CGC GTC TCG TTG CCA AGG ATG GTC TAC CCC CAG CCA AAG GTG CTG ACA CCG TGT  
AGG AAG GAT GTC CTC GTG **GTA** CCC CTT GGC TGG CTC CCA TTG TCT GGG AGG GCA CAT TCA  
ACA TCG ACA TCC TCA ACG AGC AGT TCA GGC TCC AGA ACA CCA CCA TTG GGT **TAA** CTG TGT  
TTG CCA TCA AGA AAT ACG TGG CTT TCC TGA AGC TGT TCC TGG AGA CGG CGG AGA AGC ACT  
TCA TGG TGG GCC ACC GTG TCC ACT ACT ATG TCT TCA CCG ACC AGC CGG CCG CGG TGC CCC  
GCG TGA CGC TGG GGA CCG GTC GGC AGC TGT CAG TGC TGG AGG TGC GCG CCT ACA AGC GCT  
GGC AGG ACG TGT CCA TGC GCC GCA TGG AGA TGA TCA GTG ACT TCT GCG AGC GGC GCT TCC  
TCA GCG AGG TGG ATT ACC TGG TGT GCG TGG ACG TGG ACA TGG AGT TCC GCG ACC ACG TGG  
GCG TGG AGA TCC TGA CTC CGC TGT TCG GCA CCC TGC ACC CCG GCT TCT ACG GAA GCA GCC  
GGG AGG CCT TCA CCT ACG AGC GCC GGC CCC AGT CCC AGG CCT ACA TCC CCA AGG ACG AGG  
GCG ATT TCT ACT ACC TGG GGG GGT TCT TCG GGG GGT CGG TGC AAG AGG TGC AGC GGC TCA  
CCA GGG CCT GCC ACC AGG CCA TGA TGG TCG ACC AGG CCA ACG GCA TCG AGG CCG TGT GGC  
ACG ACG AGA GCC ACC TGA ACA AGT ACC TGC TGC GCC ACA AAC CCA CCA AGG TGC TCT CCC  
CCG AGT ACT TGT GGG ACC AGC AGC TGC TGG GCT GGC CCG CCG TCC TGA GGA AGC TGA GGT  
TCA CTG CGG TGC CCA AGA ACC ACC AGG CGG TCC GGA ACC CGT GA

# 遺伝子 DNA の設計図から何ができるのでしょうか？

DNA 設計図で部品をつくり、それを組み立てたのがヒトや様々な生物です。部品はタンパク質と呼ばれます。アミノ酸がパーツとなり、集まって、タンパク質ができ、これらが集まって、ヒトの体ができます。

## ここで大事なこと

DNA の文字やその解読方法はすべての生物で共通だから遺伝子組換えができる

1. ヒトの遺伝子 酵母や動物に入れる 医薬品生産
2. ヒトの遺伝子 遺伝病のヒトに入れる 遺伝子治療
3. 有用な遺伝子 微生物や動物に入れる 有用物質生産
4. 有用な遺伝子 植物に入れる 遺伝子組換え植物
5. 遺伝子診断や DNA 鑑定も DNA の特徴を利用した方法

## 酵母への遺伝子導入実験

パンやお酒は微生物の酵母菌が働いて美味しくしています。この酵母菌に遺伝子を導入する方法を体験してみます。驚くほど簡単な操作で遺伝子を酵母菌に入れることができます。

酵母菌はアミラーゼを持っていません。そこでアミラーゼ遺伝子を酵母菌に導入します。

### 実験マニュアル参照