

平成17年度 福井大学主催 SSP講座 **FISH**

遺伝子改変マウスのGFP遺伝子の染色体上の位置の可視化と
ヒト染色体特異的DNAプローブによるFISHの検出

金津高校 出蔵淳一 野口祐揮 野村一真 藤川暁 嶋本克実先生

実施年月 平成17年 8月25日、26日
担当部所 福井大学総合実験研究支援センター
バイオ実験機器部門

実習内容

- ・GFP遺伝子の蛍光標識プローブを作製し、蛍光イメージアナライザーで確認する。
 - ・培養細胞から染色体標本を作製する。
- ・ヒト染色体特異的DNAプローブでFISHを行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

実験の内容について

実験では、以下の二つを同時進行とした。

1. 蛍光標識プローブを作製し、蛍光イメージアナライザーでGFP遺伝を確認する。

1. ニックトランスレーション

- ①GFP遺伝子をDNase I で切れ目を入れる。
- ②DNAポリメラーゼ I でDNAの修復を行わせる。その際、Aminoallyl-dUTPで標識しておく。

2. 蛍光色素の標識

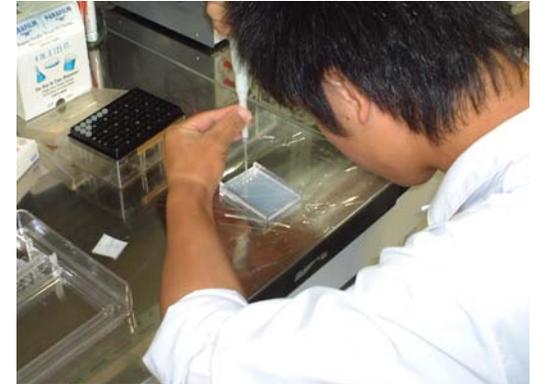
- ①NHS標識蛍光色素 (Cy3) を Aminoallyl-dUTPに結合させ、蛍光が出るようにしておく。

3. 標識プローブの認識

- ①標識プローブを熱 (75°C) により変性させ一本鎖にする。
- ②アガロースゲル電気泳動にかけ、長さの違いにより分ける。
- ③ゲルの蛍光観察により標識プローブが目的の長さ (500b以下) になっていることを確認する。



↑ スポイトで薬品注入中



↑ 寒天(ゲル)に精製したプローブを注入中。
この後これを電気泳動

↓ Typhoonであります。



2. ヒトの白血病リンパ球の染色体標本を作製し、ヒト染色体特異的プローブ(13番染色体とガン遺伝子のもの)でFISHを行い共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

1. 細胞の準備

- ①ヒトの白血病リンパ球細胞をインキュベーターで培養する。
- ②コルセミド溶液で分裂を停止させ、核内に染色体が形成された状態の細胞を多くつくる。

2. 固定

- ①0.075M KCl(低張液)に細胞を浸し、吸水して細胞が膨らみ細胞膜が破れやすい状態にしておく。
- ②カルノア液の濃度を徐々に上げて細胞を固定する。

3. スライドガラスへの展開

- ①固定した細胞を5~10cm上からスライドガラス上に滴下し、その衝撃により細胞膜を破り染色体を広げる。
- ②広がった染色体があることを顕微鏡により確認。

4. 染色体DNAの変性

- ①ウォーターバスに浸け、熱(75℃)により変性させ、DNAを一本鎖にしておく。



←液体を性格に量りとり、チューブに挿入する様子。慣れない精密機器の操作に震える手……。大学の場での研究の高度さが改めて実感されたひと時であった。



←実験で使用した遠心分離機。毎分一万数千回転という超高速で回転し、液体を遠心する。基本的に回転数が多いほど大きい音をたてるものと思われる。

5. ハイブリダイゼーション液の調整

①13番染色体のプローブとガン遺伝子のプローブをそれぞれ、熱(75°C)により変性させ一本鎖にしておく。

6. ハイブリダイゼーション

①展開させた染色体DNAにハイブリダイゼーション液を載せ、ハイブリダイズさせる。(37°Cの湿潤箱に一晩置く)

7. 洗浄

①ホルムアミド/2×SSCや0.1%NP-40/2×SSCにより結合していないプローブを洗浄する。

8. 対比染色

①DAPI対比染色液により染色体DNA全体を染色する。

②カバーガラスの周りをマニキュアでシールする。

9. 観察

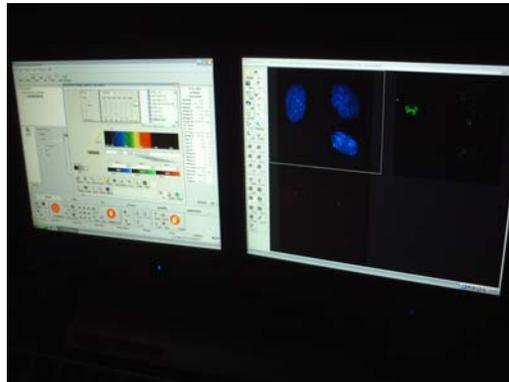
①共焦点レーザー顕微鏡で観察。



←ハイブリダイゼーション中
一定の温度で過熱中
一定時間ごとに容器を変えておりました。



共焦点レーザー顕微鏡
レーザーを使ったり使わなかったり。
室温は23度でした。

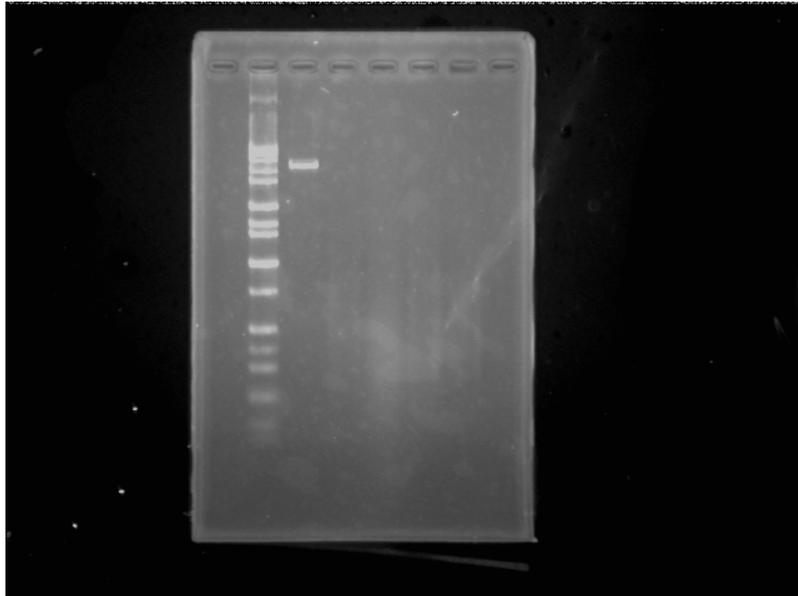


観察中

2つのディスプレイを使って拡大したり、取り込んだり。
外国製のように表示される言語は英語。それを平気で使う先生にも驚きを覚えたりもしたのだった。

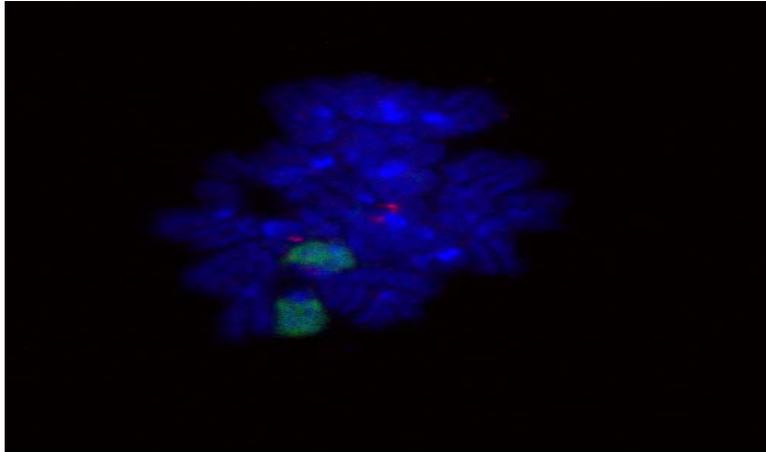
GFP遺伝子の蛍光標識プローブのゲルを 蛍光イメージアナライザーで見た結果

プローブ遺伝子は500bの長さになっている
ことが確認できる。



電気泳動の結果、プローブ遺伝子は500b以下に
分けられていることが確認できる。

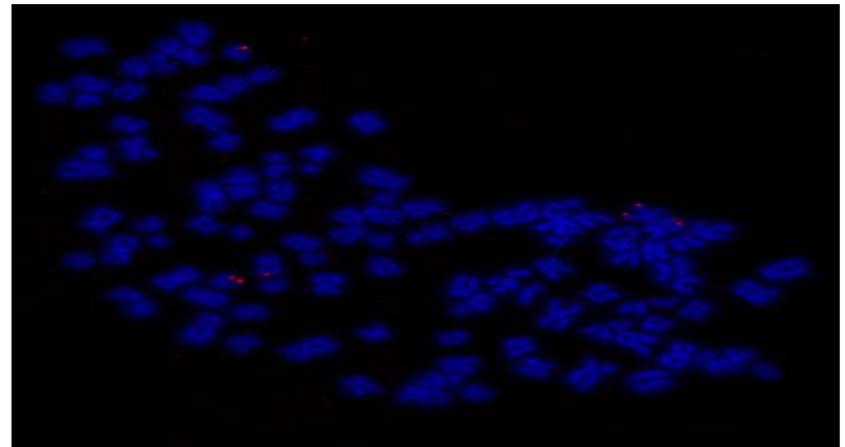
白血病のリンパ球を共焦点レーザー顕微鏡で見た結果



青く蛍光しているものが、遺伝子(染色体全体)
緑に蛍光しているものが、13番染色体
赤く蛍光しているものが、癌遺伝子。

赤い蛍光と緑色の蛍光が重なっていないこと
から、癌遺伝子は13番染色体上にはない
ということがわかる。癌遺伝子は9番染色
体上にあるらしい。

染色体の数が多ことから、おそらく細胞
2個分の染色体だろうと思われる。
細胞膜が破れて内部の染色体が広がっ
ている。



感想

- 僕達は、このような実験をして僕達の将来の道が広がったと思います。まず目を引かれたのは、見たことのない実験道具の数々です。普通は、触ることさえできない実験道具を使って実験ができたということで、僕達にとって新たな体験ができたということです。それから、難しい道具を使って顕微鏡で見たプレートは思った以上にできていて感動しました。この体験を通して実験をする楽しさを学べてよかったです。(藤川)
- 様々な実験を体験したり、講師の方々のお話を伺ってバイオテクノロジーの奥深さや、それらの技術の将来、発展を直に感じとることができたと思っています。将来自分がこのような仕事に携わったとき今回の経験が必ず何らかの影響を与えることでしょう。普通では、あまり経験できないようなことだったので深く感動しました。今後のバイオテクノロジーのさらなる発展と向上を願いたいと思います。(野村)
- 普段見たこともないような器具に囲まれての実験はとても新鮮なものでした。最先端の機器を使っての実験とは聞いていなかったなので、大学生でもなかなかできないと聞いたときは驚きもしましたが、少し嬉しくもありました。内容は高度だったので終了した今でも完全に理解したいとは言えませんが、いつかは理解できるようになりたいものです。(出蔵)
- 僕は元来、人を救いたく臨床医学に興味があり医学を志していたのだが、このSPP講座により、研究医学もなかなか面白い分野あると同時に、医学全体に幅広い貢献をすることがわかった。大学院生やスタッフの方たちもなかなかさせてもらえないという今回の実験の内容そのものは高校生の僕たちにとっては大変難解なものであったが、現代の最先端の科学技術を自分の体で味わえて滅多にない大変貴重な体験であったと思う。(野口)