

平成17年文部科学省 サイエンス・パートナーシップ・プログラム

siRNAによる細胞内におけるGFP発現の抑制

日時	8月11日(木)、12日(金)
会場	福井大学医学部
高校	丹生高校
教員名	藤井 克郎
作成者	為国 直孝 鈴木 智 山内 康平 古川 大輝

課題の目的と背景

目的

- 1.siRNAの働きを観察する
- 2.GFP,DsRedに対しての働きを確認

背景

- 1.特定の遺伝子の働きを抑制する遺伝子ノックアウト動物を作り出す
- 2.特定の遺伝子の働きを抑制できるsiRNA (small interfering RNA) が注目を浴びている
- 3.遺伝子組み換え動物を作るには、難しい過程を克服する必要がある。

実験の手順

1, siRNAの確認

- ・・・溶液中のsiRNAの確認とその大まかなサイズを確かめる。

2, プラスミドの精製

- ・・・増殖した大腸菌からプラスミドを抽出し精製する。

3, プラスミドの定量

- ・・・プラスミドの濃度を測定する。

4, プラスミドの確認

- ・・・精製した液の中にプラスミドがあるのか確認する。

5, siRNAとプラスミドの トランスフェクション

- ・・・siRNA及びGFPプラスミドを培養細胞に導入する。
また、DsRedプラスミドも同様に細胞内に入れる。

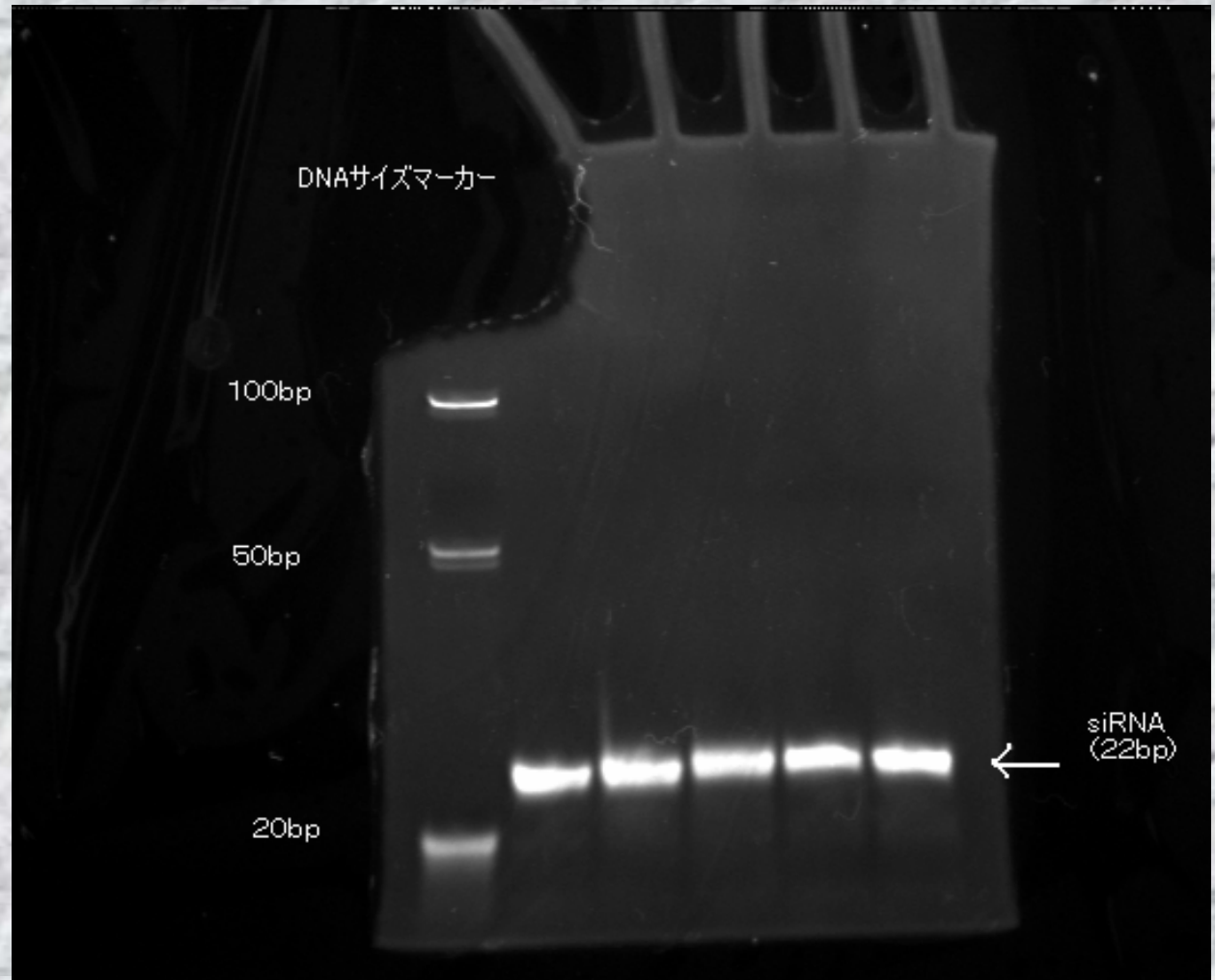
6, 蛍光顕微鏡による

- ・・・GFPの発見及びGFPsiRNAによる発現抑制の効果 蛍光顕微鏡で観察する。またDsRedについても同様に観察する

実験結果

1. siRNAの確認（ポリアクリルアミド「ゲル電気泳動による」）

siRNAの大きさは22bpで、DNAサイズマーカーの20bpのバンドよりややおおきめにでている。



2. プラスミドの精製

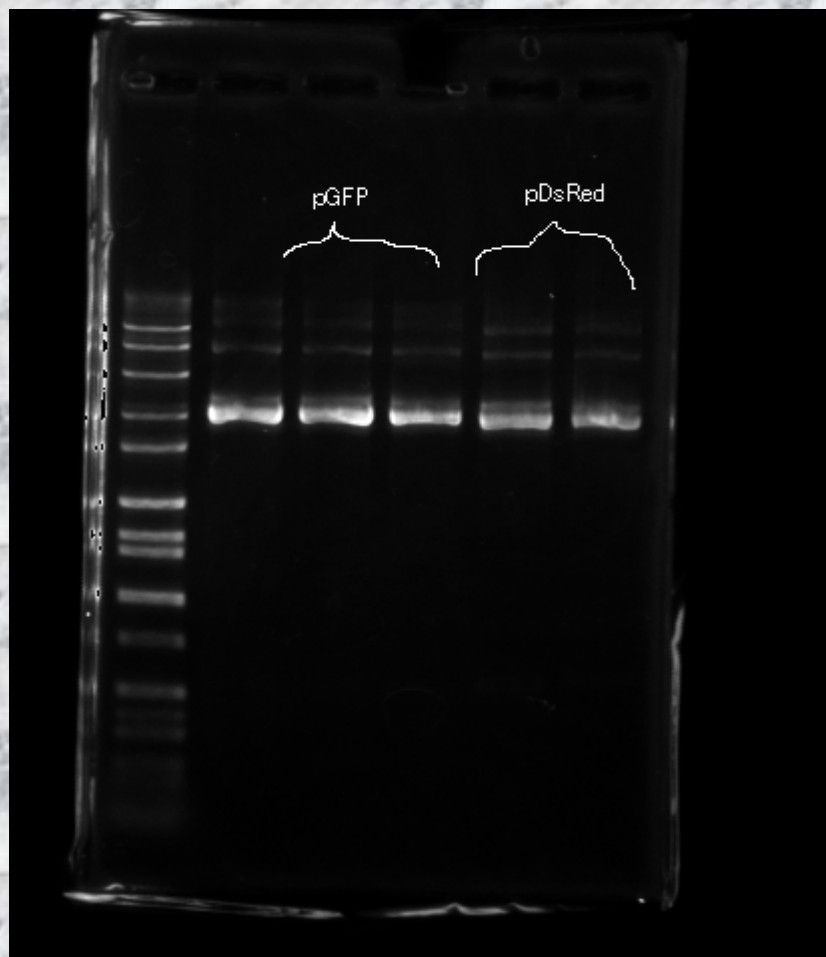
pGFP（GFPプラスミド）を導入した大腸菌 および
DsRed（DsRedプラスミド）を導入した大腸菌の培養液
からプラスミドを溶出した。

3. プラスミドの定量

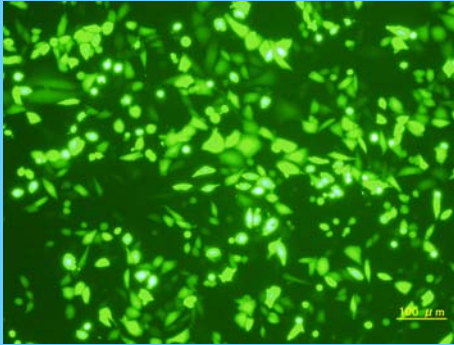
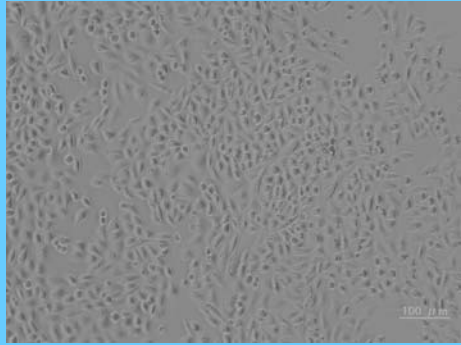
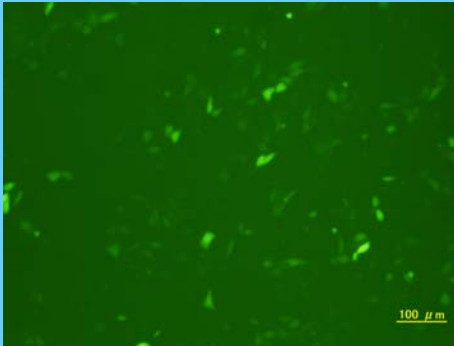
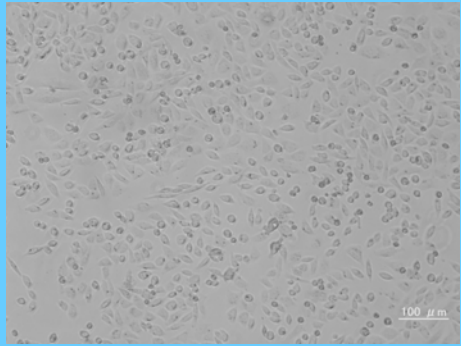
それぞれからとったプラスミドの溶液の濃度を、260nmの紫外線の吸収度から測定し、それぞれ100ng相当の量を含む溶液をとって、電気泳動にかけた。（結果4）

4. プラスミドの確認（アガロースゲル電気泳動による）

右のように、pGFP、pDsRedとも、ほぼ同じ大きさのバンドとして現れた。およそ、4000bpの大きさであった。



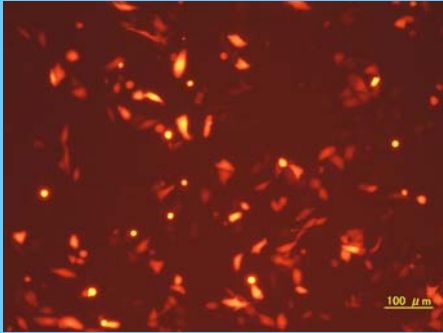
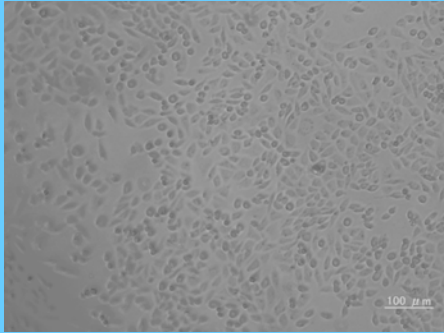
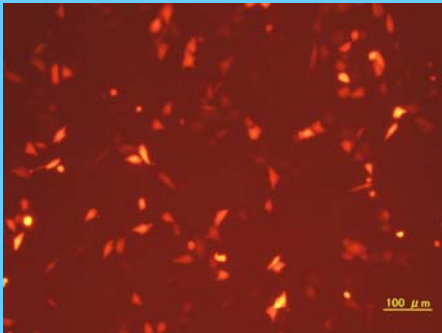
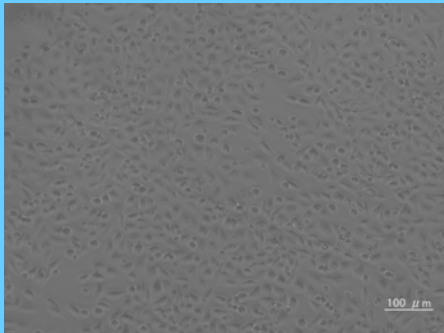
5. 蛍光顕微鏡による確認

pGFPのみ		
pGFP +siRNA		

結果(pGFP)

pGFPのみの場合は、GFPの働きが抑制されないので、緑色に光る。

pGFP+siRNAの場合は、GFPの働きが抑制されるのであまり光らない。

pDsRedのみ		
pDsRed +GFP siRNA		

結果(pDsRed)

pDsRedの場合、siRNAの働きはpDsRedの働きの抑制にならないので、siRNAを入れようが入れまいが赤く光る。

実験結果のまとめ

- ・pGFP+siRNAは発現が抑制された。

siRNAの2本鎖のうちの片方の鎖の塩基配列が、GFPプラスミド中のGFP遺伝子から転写されてできたGFPmRNAに相補的に結合して分解を誘導したためである。

- ・pDsRed+GFPsiRNAは発現は抑制されなかった。

なぜならば,pDsRedにはGFPsiRNAが切断するための塩基配列が一致する場所がないためだとわかった。

実習に参加して...

今回このSPPに参加してみてとても楽しかったと同時に色々と凄さを感じさせられました。これだけの実験観察をするのにとても時間がかかることや結果においての明確な違いがわかることなど感心しました。私はこの実験に参加しより多くの興味を得ることができたと思います。

使ったことのないピペットに最初は苦労しましたが担当の先生のアドバイスのおかげで何とか使うことができました。2日間に渡り課題の解決に取り組み色々大変だったが解決したときにはとてもうれしく今回SPPに参加できて本当によかったです。

今回、SPPに参加して、様々な経験を得ることが出来て良かったと思います。実験では初めてのことも多く、色々と複雑だったけど、先生方の指導のおかげで無事成功させることが出来ました。今回のことを生かせるように頑張っていきたいと思います。

顕微鏡でいろいろなものをでっかく見れて楽しかった。