

「クラゲの蛍光蛋白の秘密とその利用」

実習課題E：DNA Sequencing

GFPトランスジェニックマウス(Green Mouse)のGFP遺伝子構造解析

福井県立武生高等学校

実習内容

1 DNAの抽出

組織から解析に必要なDNAを抽出する。

2 GFP遺伝子の確認

マウスのゲノムに挿入されたGFP遺伝子の塩基配列を確認する。

3 GFP遺伝子挿入部位の塩基配列の決定

GFP遺伝子が、トランスジェニックマウスのゲノムのどの部分に挿入されたかを

Genomic DNA Walking により確認する。

目的

遺伝子解析に必要なDNAの抽出・制限酵素による断片化・PCRによる遺伝子の増幅・電気泳動による断片のサイズ測定・シーケンサーによるDNA塩基配列の決定・Genomic DNA Walkingによる未知DNA塩基配列の決定法 以上の実験操作(Protocol)の体験を通して、遺伝子構造解析の基礎的手法の習得と、基本原理の理解をめざす。

1 DNAの抽出

Protocol-1

1 組織からのDNAの抽出

(1) Homogenize

1.5mlチューブ PBS:300 μ l+肝臓片:3mm角 Green Mouse,Control

(2) 遠心

5000rpm,5min. 上清を捨てる

(3) 膜の破壊, タンパク分解

Cell Lysis Solution(界面活性剤):300 μ l homogenize

→ ProteinaseK(最強のタンパク分解酵素) Solution:1.5 μ l → 55°C over night

(4) RNAの分解

RNase A(RNA分解酵素) Solution:1.5 μ l 25回転倒混和 → 37°C 60min. → 室温まで放置

(5) タンパク残留物の沈澱

Protein Precipitation Solution:100 μ l 20sec. vortex → 15,000rpm 3min.遠心 上清を新しい1.5mlチューブへ

(6) DNAの凝集

100% Isopropanol:300 μ l 50回転倒混和 → 15,000rpm 1min. 遠心 → 上清を捨てる

(7) DNAの洗浄

70% Ethanol:300 μ l → 15,000rpm 1min. 遠心 → 上清を捨て沈澱(DNA)を乾燥

(8) DNAの溶解

DNA Hydration Solution:25 μ l

1 DNAの抽出

Protocol-2

2 濃度測定

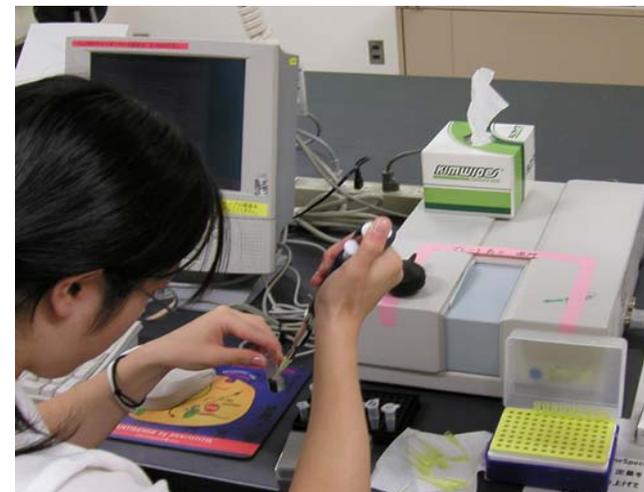
(1) DNAサンプルの希釈($\times 5$, $\times 50$)

新しいチューブに 滅菌水: $8\ \mu\text{l}$ +DNA Solution: $2\ \mu\text{l}$ ($\rightarrow \times 5$)

新しいチューブに 滅菌水: $18\ \mu\text{l}$ + $\times 5$ DNA Solution: $2\ \mu\text{l}$ ($\rightarrow \times 50$)

(2) DNA濃度測定

分光光度計(Gene Spec III)による自動濃度測定



分光光度計(Gene Spec III)

Results & Discussion

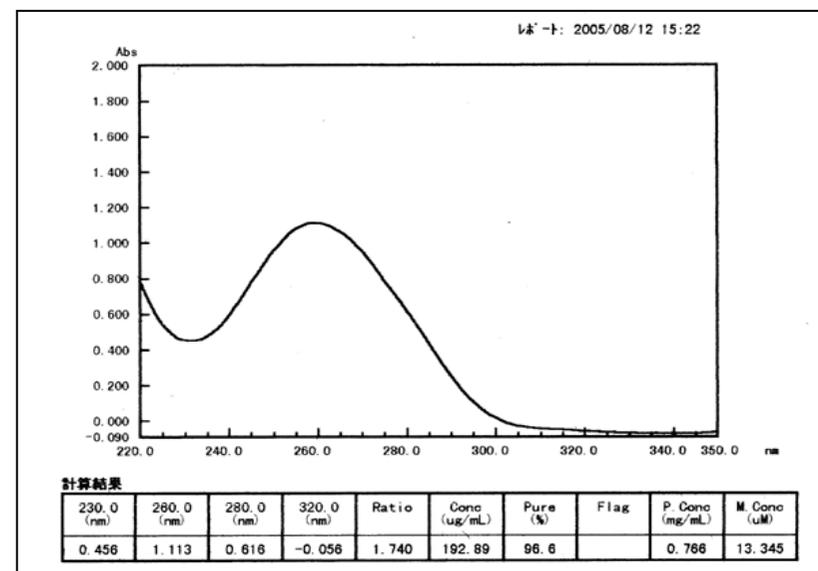
右図のような吸収スペクトルが得られた。

(核酸の吸収極大= 260nm)

タンパクの吸収極大との比= 1.74

(>1.80 の時, 純度の高いDNAが得られたと言える)

DNAの濃度は $192.89\ \mu\text{g/ml}$



2 GFP遺伝子の確認

Protocol-1

1 GFP遺伝子の増幅 (PCR反応: Polymerase Chain Reaction)

(1) PCR準備

0.5mlチューブに Master Mix: $5\mu\text{l}$ + Primer Upper: $1\mu\text{l}$ + Primer Lower: $1\mu\text{l}$
+ Template: $1\mu\text{l}$ + dWater: $2\mu\text{l}$ → 遠心

Primer: GFP遺伝子をはさむ部分に特異的な塩基配列

{ GFP Upper Primer 5' CAAGGGCGAGGAGCTGTTCA 3'
GFP Lower Primer 5' TCGTCCATGCCGAGAGTGATC 3'

(2) PCR反応

Thermal Cycler

95°C: 1min. (DNAを1本鎖に)

60°C: 30sec. (アニーリング; プライマーと結合) } 30Cycle

72°C: 1min. (相補鎖の延伸)

(3) DNAの確認 (電気泳動による, 増幅されたDNA断片の確認)

PCR後のDNA溶液: $2\mu\text{l}$ + Loading Dye: $1\mu\text{l}$ (パラフィルム上で混和)

→ 1% Agar-gel に apply 電気泳動: 100V, 35min.

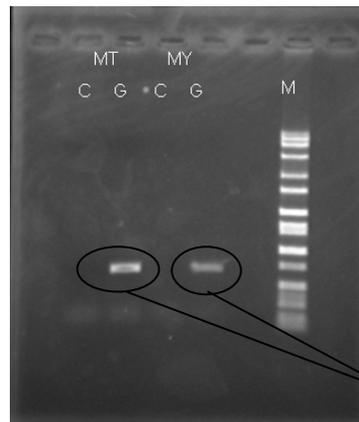
→ Ethidium bromide で染色 紫外線下での蛍光を写真撮影



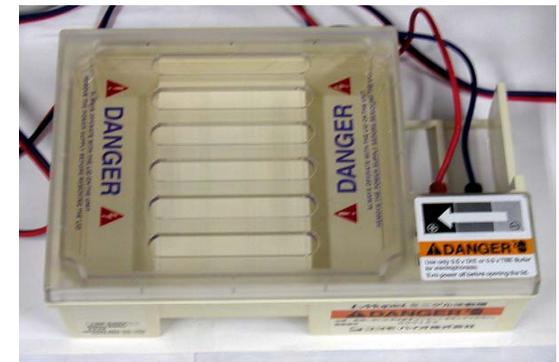
Thermal Cycler (PCR装置)



蛍光読み取り装置



GFP遺伝子断片



電気泳動槽

2 GFP遺伝子の確認

Protocol-2

2 増幅したGFP遺伝子の精製

(1) GFP遺伝子溶解

1-(3)の残りのPCR産物 + 滅菌蒸留水 = $50 \mu\text{l}$

(2) GFP遺伝子(DNA)の沈澱

(1) + Pellet Point Co-Precipitant(共沈剤): $1 \mu\text{l}$ + 3M 酢酸ナトリウム: $5 \mu\text{l}$

+ 100% Ethanol: $150 \mu\text{l}$

→ 攪拌 → 室温放置 10min. → 15,000rpm 5min.遠心 → 上清を捨てる

(3) DNAの洗浄

(2)の沈澱 + 70% Ethanol: $200 \mu\text{l}$ → 15,000rpm 5min. 遠心 → 上清を捨てる

→ ふたをあけて乾燥 → 滅菌水: $10 \mu\text{l}$ を加え → シーケンスサンプルとする。

3 シーケンス反応

(1) Sample: $1 \mu\text{l}$ + Primer($5 \mu\text{M}$): $1 \mu\text{l}$ + PreMix: $4 \mu\text{l}$ + 蒸留水: $4 \mu\text{l}$ = $10 \mu\text{l}$

PrimerはUpper or Lowerのどちらか一方 (2,Protocol-1 1と同じ)

(2) PCR Thermal Cycler

95°C:20min.(DNAを1本鎖に)

50°C:15sec.(アニーリング;プライマーと結合) 30Cycle

60°C:1min.(相補鎖の延伸)

(3) シーケンス反応産物の精製 手順2と同じ

+ホルムアルデヒド: $12 \mu\text{l}$ に溶解

4 塩基配列の決定

DNA Auto Sequencer による

3 GFP遺伝子挿入部位の塩基配列決定 (Genomic DNA Walking)

Protocol

1 Genome DNAの制限酵素によるランダムな断片化と既知塩基配列を含む断片の増幅

(1) 制限酵素RasI(GT!AC)で処理した全ゲノムDNA断片にアダプター配列を結合させる(Ligaseによる)

(2) Primary PCR : Primer GWP1とenh1でPCR反応 (既知配列を含む断片の増幅)

——ここまで処理済み

2 挿入部位の増幅と精製

(1) Secondary PCR

Template (Primary PCR 産物): $2\ \mu\text{l}$ + Master Mix: $10\ \mu\text{l}$ + Upper Primer(GWP2): $2\ \mu\text{l}$
+ Lower Primer(enf2) + 蒸留水: $4\ \mu\text{l}$ PCR (2,Protocol-1,1(1)と同じ)

GWP2 5' ACTATAGGGCACGCGTGG 3'

enf2 5' GCCATTTACCGTAAGTTATG 3'

(2) 電気泳動による増幅された断片の回収

電気泳動後, 目的のバンドをナイフでgelごと切り出す

(電気泳動は 2,Protocol-1,1(2)と同じ)

(3) DNAの精製

a.Membrane Binding Solution: $10\ \mu\text{l}/10\text{mg}$ 65°C gelが溶けるまで

b.SVミニカラム(ふるい) on コレクションチューブにgel溶解液 室温,1min.

c.15,000rpm 1min.遠心 ろ液廃棄

d.Membrane Wash Solution で洗浄(1回目: $700\ \mu\text{l}$,2回目: $500\ \mu\text{l}$) 各回後

15,000rpm,(1)1min.,(2)5min. 遠心

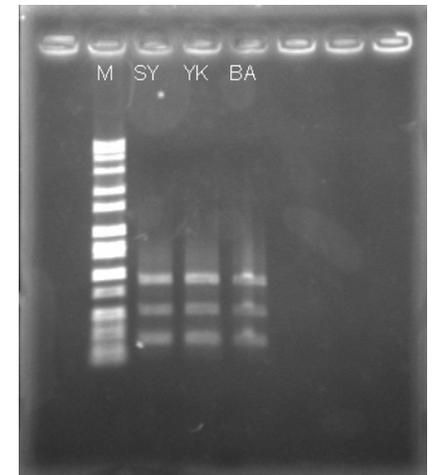
e.Nuclease-Free Water: $30\ \mu\text{l}$ 1min.洗浄 → 15.000rpm.1min.

3 DNAの濃度測定

吸光光度計でDNA濃度測定 (2,Protocol-2,2と同じ)

4 シークエンス反応 (2,実験手順-2,3と同じ)

5 DNAシーケンサーによる塩基配列の決定 (2,Protocol-2,3と同じ)



3 GFP遺伝子挿入部位の塩基配列決定 (Genomic DNA Walking)

Results & Discussion

下はシーケンサーによって決定された塩基配列

tactataggg_cacgcgtggt cgacggcccg ggctggtacc actgaacaac agttgttaa

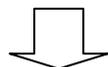
Upper Primer

gtcttgaac tgcagttcat ggtgacatct tcaccctcct ggatgctcag agcctgaaga
ttctcttctc cccattggct cttagcccct acatagaaac acaggccaga gaacaagagt
cagtgagtat gttttcaaat tgcatttcca aatagagcca cgtagcctct gaactcaggt
ctctcattc ctatcactac cagcccaaaa ctacaggcc acttgaacc atagagtcac
acaaagata ttcccagaa tctgttcagt tttcttgctt tattgatgtc acaggaaacg
ctgtgctgca cctgaagtg gaacctggct cctaggacag aagagtctgt tctggctgat
gagtattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca
tatatggagt tccgcgttac ataacttac gtaaattggca

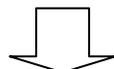
Lower Primer

黒＝アダプター配列 青＝明らかになった未知配列

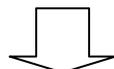
赤＝挿入されたEnhancerの配列(既知配列)



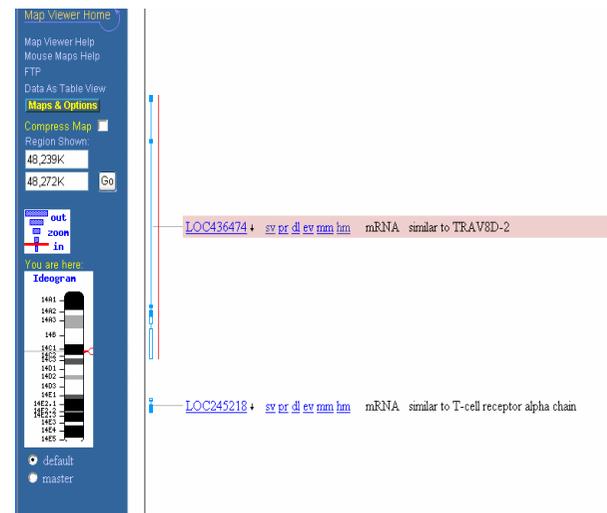
National Center for Biotechnology information
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) にアクセス, BLASTで検索



データベース上の *Mus musculus* T-cell receptor 遺伝子の一部
と95%の塩基配列が未知配列の部分で一致



GFP遺伝子とその前後の配列はマウス第14染色体の中央部に挿入
されたことが判明



Genomic DNA Walking について

DNAの未知塩基配列を決定する際に使う方法

1 ショットガン法

複数の制限酵素を使いランダムに断片化したDNAの塩基配列を決定し、コンピュータを使って重なるの部分を見つけてゆく。

利点：一挙に長大なゲノムDNAの塩基配列を決定できる。

欠点：正確さに欠ける部分がある。

2 Genomic DNA Walking法

既知配列内と、その上流（下流）にプライマーを設定し、上流（下流）の塩基配列を決定してゆく。

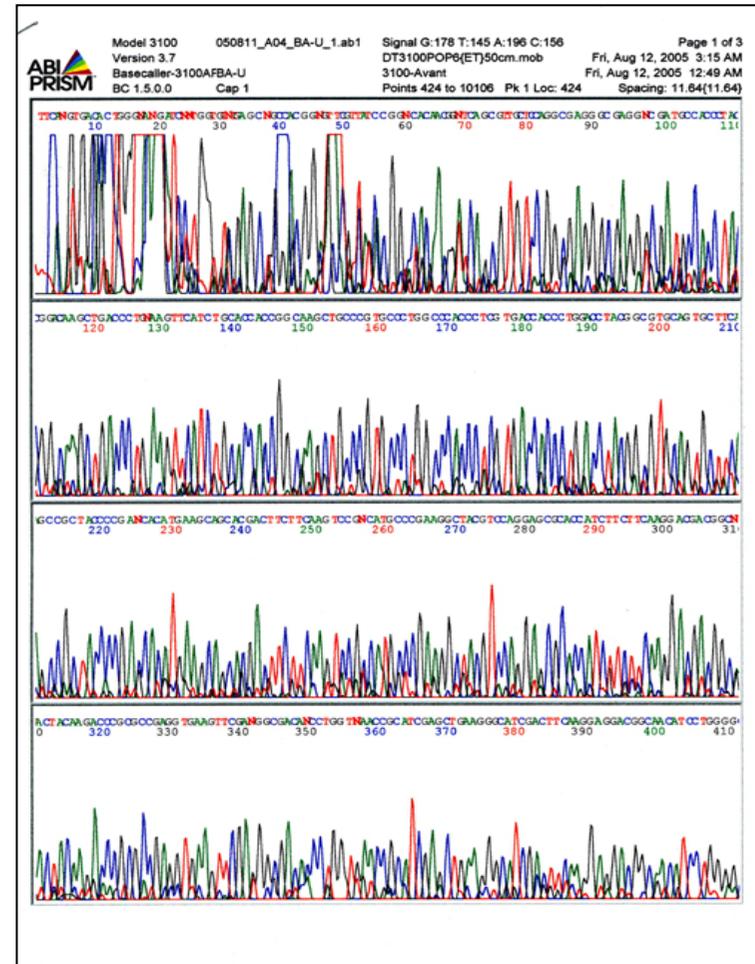
決定された部分を既知配列とし、さらに隣接する配列を順次決定してゆく。

利点：正確に塩基配列を決定することができる

欠点：一度に長大なDNAの塩基配列を決定することはできない。

オートシーケンサーの結果

オートシーケンサーは断片化されたポリヌクレオチドの最終端にあるヌクレオチドの発する蛍光を感知して、その結果をグラフで表す。



Conclusions & Opinions

- 1 グリーンマウスの肝臓からDNAを抽出した。
- 2 抽出したDNAから、GFP遺伝子をPCRにより増幅しシークエンサーで塩基配列を確認した。確認できた塩基配列は、データベースのものとはほぼ一致した。
- 3 GFP遺伝子が挿入されている部位をGenomic DNA Walking法で確認した。遺伝子はマウス第14染色体のT細胞レセプター遺伝子に接して挿入されていることがわかった。

今回のSPPでは、様々な機器を用いて高校で出来ないような実験をする事が出来、大変参考になり、高校で習った事の復習にもなり、参加する事が出来て良かった。やはり難しい内容ではあったが、先生方のサポートのお陰で、自分なりに納得して実験する事が出来た。丸々2日間実験をするというのはもちろん初めてだったのでかなり疲れたが、特に疲れたのはDNAの塩基配列を解読するという工程だった。また、初日に見た遺伝子組換えをされて発光するマウスは印象深かった。最後に、高校では出来ない深い内容を扱えるという点と、大学の良い雰囲気味わえるという点で、私はこのSPP事業を後輩に勧めたいと思うし、是非続けて行ってほしいと思う。

教科書や授業で見ただけだった機器がたくさんあったのが一番の感動だった（特にシークエンサー）。塩基配列を調べるのにはかなりの根気が必要だと身にしみた。1マイクロリットルの量の少なさから（最初見えなかった）、生物の身体の複雑さが感じられた。

二日間はとても大変でも難しい実験でしたが、貴重な体験ができました。ピペットマンを何回も使ったので随分なれました。実験器具が数多くそろっているのがびっくりしました。今回の実験を通してますますバイオテクノロジーに興味を持ち、大学で研究できることがとても楽しみにになりました。

機械が初めて使うものが多く、実験の内容も高度で理解するのが難しかったけれど楽しかった。はじめは失敗してうまく結果が出なかったのでガッカリしました。その分もう一度チャレンジしてうまくいったときの喜びはひとしおでした。A, T, G, Cと塩基配列をパソコンに入力したときは、長かったので夢に出てくるのではないかと思いました。正解と合っている箇所があつてよかったです。また、大学の先生方に興味、関心のある話をお聞きできてよかったですと思います。これからの進路にもいい参考になったと思います。