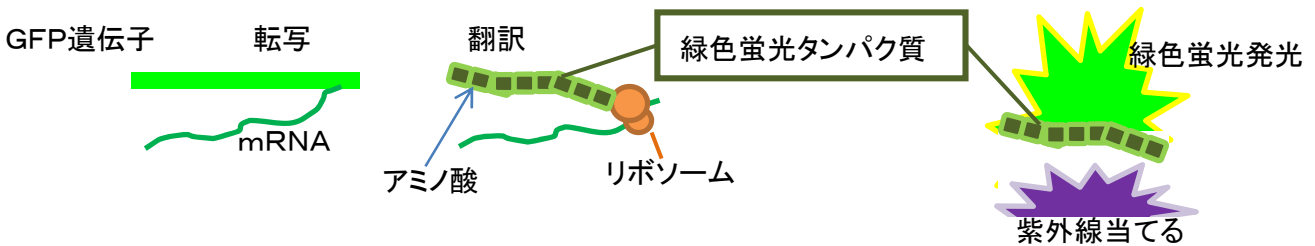
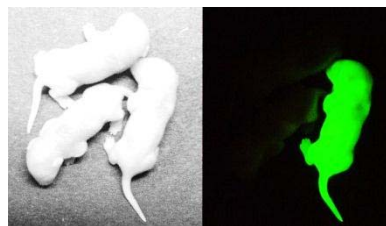


## 遺伝子を理解する分子生物学実験実習会(基礎編)

### 細菌を用いた形質転換実験の原理

目的: 大腸菌(細菌)に緑色に光るタンパク質をつくる遺伝子(GFP 遺伝子)を導入して、大腸菌の性質(形質)を緑色に光るように変化(転換)させる。

GFPの遺伝子とはオワンクラゲが発光する元になる蛍光タンパク質をつくる遺伝子で、この蛍光タンパク質は日本人の下村脩(おさむ)先生によって 1961 年、紫外線が当たると緑色に光る「緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein; GFP)」として取り出されました。現在では、様々な実験の分野でマーカー遺伝子(目印となる遺伝子)として使われています。下村先生は 2008 年にノーベル化学賞を受賞しました。



### 実験の原理1 遺伝子(GFP 遺伝子)を導入するための準備

大腸菌の中に GFP 遺伝子を導入するには、遺伝子が大腸菌に運び込むことができる遺伝子の“運び屋”(ベクターという)である環状の DNA であるプラスミドを使う。オワンクラゲが持つ緑色蛍光タンパク質をつくる遺伝子(GFP 遺伝子)を組み込む必要がある。(遺伝子組換え)

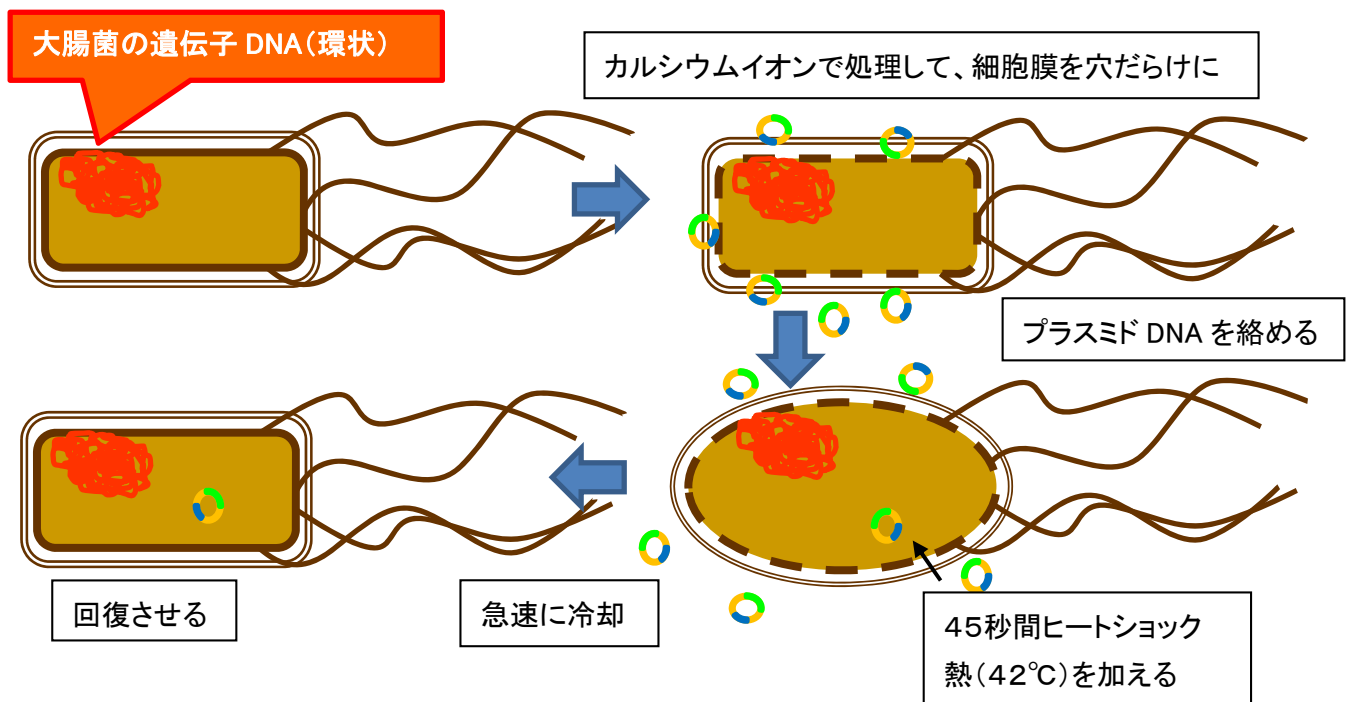
プラスミドDNAに GFP 遺伝子を組み込めば、このプラスミドDNAごと大腸菌内に導入することができる。

今回使うプラスミド pGLO は遺伝子組換えによりできた“組換えDNA”である



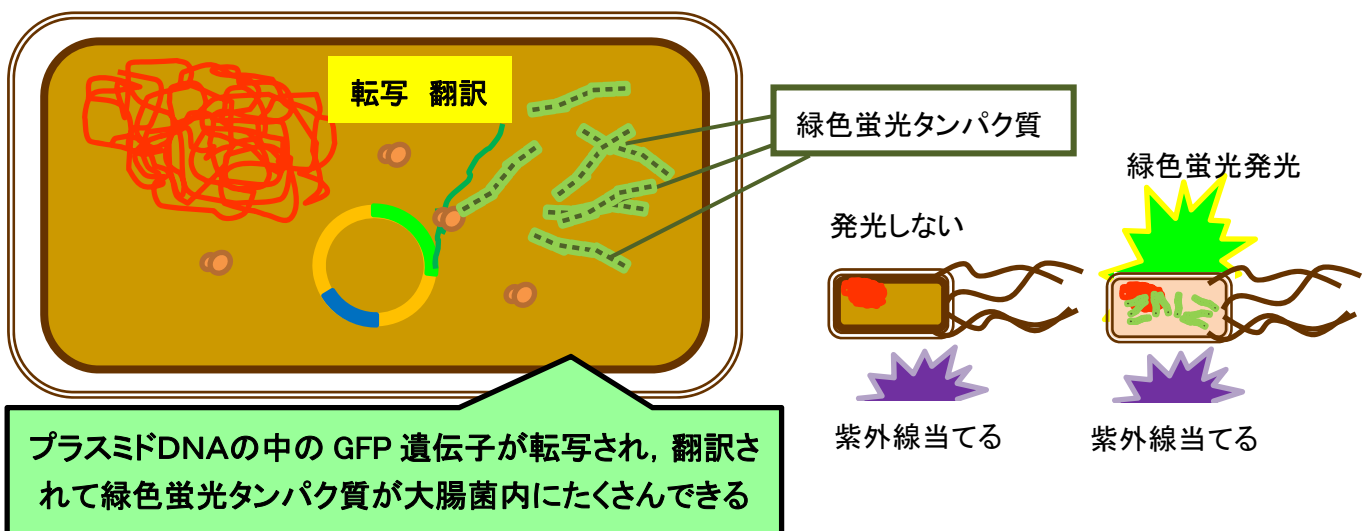
## 実験の原理2 大腸菌にプラスミド DNA を入れるには

大腸菌の外膜(細胞壁に当たる)は物質が容易に通り抜ける。プラスミドDNAも容易に通り抜ける。  
大腸菌の内膜は細胞膜で基本的に物質を通さない。



## 実験の原理3 プラスミドDNAが導入された大腸菌が緑色に光る理由

大腸菌の遺伝子と同じようにプラスミドDNAも発現(遺伝子の情報に基づいてタンパク質ができる)する。

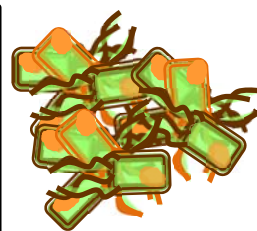


大腸菌は緑色に光らない

↓  
GFP遺伝子(GFP)導入

↓ GFP発現 GFPタンパク質合成

GFPが大腸菌に蓄積 紫外線を照射すると緑に光る  
(光らない→光る 形質転換した)



緑色蛍光タンパク質をつくれる大腸菌が、分裂して増えて固まり(コロニーという)をつくれればどうなるだろうか?

#### 実験の原理4 GFP遺伝子の転写に必要なもの

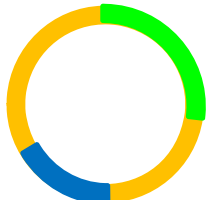
GFP遺伝子が転写されてGFPのmRNAができるためには、転写を活性化するのが必要です。

アラビノースという糖があれば、大腸菌がそれを取り込み、pGLOプラスミド内にあるGFP遺伝子の転写が開始されます。転写されてmRNAができると、翻訳され緑色蛍光タンパク質が大腸菌内につくられます。

#### 実験の原理5 抗生物質アンピシリン耐性をもつ遺伝子を入れる理由

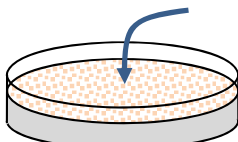
抗生物質とは、細菌を殺す薬剤です。アンピシリンも抗生物質ペニシリンの一種でアンピシリンのある培地では、大腸菌は細菌なので生育できません。

実験に使ったpGLOというプラスミドには、Amp遺伝子が組み込まれている。Amp遺伝子からできるタンパク質は抗生物質アンピシリンを不活性化する。このため、抗生物質の入った培地に大腸菌を広げるとプラスミドが入った大腸菌だけが生育できます。



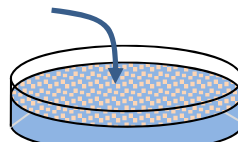
Amp 遺伝子(抗生物質に打ち勝つ物質を作る遺伝子)

100,000 個の大腸菌

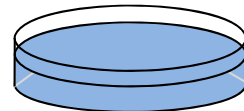


アンピシリンの入ってない培地

100,000 個の大腸菌生育



Amp (アンピシリン) の入った培地



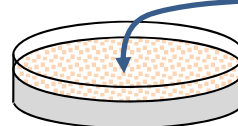
Amp (アンピシリン) の入った培地

全ての細菌死滅

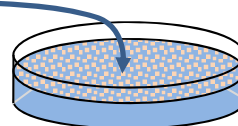
100,000 個の大腸菌のうち、10個だけにpGLOプラスミドが導入されている



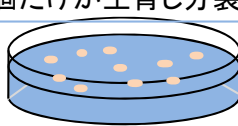
10,000:1



100,000 個の大腸菌生育



Amp (アンピシリン) の入った培地



pGLOプラスミドの入った大腸菌 10 個だけが生育し分裂できる

Amp (アンピシリン) の入った培地

抗生物質アンピシリンがあると生育できない



アンピシリン耐性遺伝子(Amp 遺伝子) 導入

↓ Amp遺伝子からアンピシリンを不活性化するタンパク質合成

アンピシリンがあっても生育できるようになる

(抗生物質があると生育できない→生育できる 形質転換した)