北大グローバル COE プログラム
「統合フィールド環境科学の教育研究拠点形成」

2011 IFES-GCOE ラボ実習

環境生物学実習 報告書

2011年12月 5日〜16日

北海道大学大学院環境科学院

グローバルCOEプログラム「統合フィールド環境科学の教育研究拠点形成」
平成23年度グローバル COE 人材育成自由企画 A 報告書

1. 企画課題名: 平成23年度(2011) IFES-GCOE ラボ実習（環境生物学実習 I・II・III）

2. 企画担当者

代表担当者:森川正章（環境生物科学部門・環境分子生物学分野）
内線: 2253, e-mail: morikawa@ees.hokudai.ac.jp
共同担当者:山崎健一（環境生物科学部門・環境分子生物学分野）
内線: 4522, e-mail: ymzk@ees.hokudai.ac.jp
鷲尾健司（環境生物科学部門・環境分子生物学分野）
内線: 2281, e-mail: washi@ees.hokudai.ac.jp
三輪京子（創成研究機構・L-Station）
内線: 9284, e-mail: miwakyoko@cris.hokudai.ac.jp
本間恵美（環境生物科学部門・環境分子生物学分野）
内線: 2253, e-mail: emb_hisyo@ees.hokudai.ac.jp

3. 参加受講者

Mr. Md. Shariful Islam （バングラディシュ）
北海道大学大学院環境科学院環境起学専攻 博士後期課程1年生

Mr. Refi Ikhtiari （インドネシア）
北海道大学大学院環境科学院環境起学専攻 博士後期課程1年生

Ms. Parvin Begum （バングラディシュ）
北海道大学大学院環境科学院環境起学専攻 博士研究員

以上3名

4. 企画の内容と実施期間

環境生物学実習 I 「植物の遺伝子発現解析」
副題: タマネギ表皮細胞への遺伝子導入と発現解析他 期間: 12 月 5-8 日
環境生物学実習 II 「ヒト遺伝子多型の検出」
副題: ヒト由来アルデヒド脱水素酵素遺伝子多型 期間: 12 月 12-14 日
環境生物学実習 III 「環境変動に適応するための遺伝子誘導と抑制」
副題: 大腸菌ラクトースオペロンの調節機構 期間: 12 月 15-16 日

5. 企画の目的

幅広い技術および視野を持った環境科学研究者を目指す大学院学生（修士課程修了以上）を主たる対象として、ラボ系の環境生物学研究手法、特に分子生物学的実験技術を習得しようとする受講生を募集し、ヒト毛母細胞・植物細胞・微生物細胞を対象としてそれらの一般的な取扱い手法を修得させる。さらに、植物細胞を使った遺伝子導入法と環境モニタリング法（課題 I）、アルコール体質（人種、家系）とアルデヒド脱水素酵素活性との相関を考察するヒト遺伝子多型解析（課題 II）、および微生物細胞を使った環境変化に応答するための遺伝子誘導と抑制の観察（課題 III）に関する分子生物学的あるいは生化学的手法を学ぶことにより、生物から見た地球環境科学を意識するという研究視野を学ばせることを目的とした。また、専門や国籍の異なる大学院学生・若手研究者間の学術交流および文化交流の場を提供する効果も期待した。

6. 成果の概要

昨年度と同様に実習期間を二週間とした。

課題 I では、先ず直径 1.5-3,0μm の金粒子 5mg を洗浄後 DNA 溶液に浸漬し表面へ DNA を付着させた。次に1センチ角程度に切ったタマネギを薄皮を上にシャーレに置き、上記の金粒子を遺伝子導入装置にセットした。真空ポンプにより 600mHg まで減圧したところでバルブを一気に解放することで加速された金粒子をタマネギに打ち込んだ。25℃で一晩静置した後に表皮細胞をピンセットで注意深く剥離し、スライドガラスにのせ、タマネギ細胞に導入された遺伝子を蛍光顕微鏡で観察した。

課題 II では、受講者の合意のもと、各自の毛髪から所定の手法により DNA を調製した。続いて、アルコール代謝に関わる酵素遺伝子として一塩基多型が知られているアルデヒド脱水素酵素遺伝子について特異的プライマーを組み合わせた PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）を行った。その結果をゲル電気泳動法により解析し、各自の遺伝子型（父型と母型）に関する情報を得た。一方、実際のアルコールに対する代謝特性（表現型）を知るために、アルコールパッチテストを行い色調の変化をしらべた。以上の結果から、ヒトの遺伝子型と表現型との相関性について考察し、環境因子および人種や家系による分布の偏りについて考察した。

課題 III では、生物細胞の環境応答の基本メカニズムを理解するために、大腸菌を用いて単糖であるグルコースと二糖であるラクトースを同時に与えた場合、いずれの炭素源を利用するかについて培養実験を行なった。結果は予想通り、利用し易いグルコースが先ず消費され、その後により構造の複雑なラクトースが消費された。続いてこの現象の分子生物学的背景として、グルコースによってラクトース代謝に関わる遺伝子群の発現が「抑制」される様子とその消費とラクトース（誘導物質）による抑制解除すなわち「誘導」が時間経過と共に切り替わる様子を生化学的手法で確認した。

以上、それぞれ文化的および学術的背景の異なる参加者であったが、少人数制であったため、二週間の実習期間を通じて参加者同士の交流も深く、密度の高い充実した企画となった。

7. 受講生によるレポート

Report of Environmental Biology Laboratory Course I, II, III.

Dec 7 – 16 , 2011

Refi Ikhtiari

I. Introduction

It was a memorable experience to join with GCOE Program entitled "Environmental Biology Laboratory Course I, II and III", we really enjoy this class. All courses are very interesting and surely it could elevate our knowledge. The courses that I have taken are;

Course no.I: Reporter assay utilizing genetically modified *Arabidopsis thaliana*

Course no.II: Analysis on the polymorphisms of a human aldehyde dehydrogenase gene

Course no.III: Regulation mechanism of *E.coli* lactose operon

Herewith I would like to convey the highest gratitude and appreciation for warm-hearted guidance, kindly assisstance and valuable discussion to the following persons:

1. **Morikawa sensei**: who has been a chair of this short program and paid special attention to sharif san and me during the course no III.
2. **Yamazaki sensei**: who has not only shared his knowledge on plant science through discussions but also he could make lab practice goes to be fun.
3. **Washio sensei**: who has given an eperience to extract and see the DNA of mine, he had great effort to re-explain the course in english.
4. **Laury san**: who has translated the japanesse languange during the first course and assissted us during lab practice.
5. **Honma san**: who has kindly assisted in administration, registration and providing material course.

You have made a great course and it has really inspired us to doing our research. Thank you very much.

II. Summarized Report

Course I: Reporter assay utilizing genetically modified *Arabidopsis thaliana*

- Day 1st (December 7th)

  We prepared the seed for plant biosensor analysis of genetically modified *Arabidopsis thaliana*. By using DMSO as negative control and adding progesterone (10 μM and 100 μM) to other sample in order to see it's interaction with three artificial genes introduced to *Arabidopsis thaliana*.

  There are three modified genes employed in our samples:

  - Effector I as progesteron recognizer/receptor,
  - Effector II as chimeric co-activator
  - Reporter gene induced GUS activity that described how plant responses to progesterone.

  The seed then vernalized to be used for the next two days.

- Day 2nd (December 8th)

  We had fun activities to observe the leaves of *Arabidopsis thaliana* under microscope. We learned how to cut the leaf, digest its cell walls and produce protoplast. It was really interesting to see the leaf's physiology in micro-scale. We have succesfully seen the protoplast, trichome, spherical mesophyll cell and cylindrical xylem.

- Day 3rd (December 9th)

  We stained the seedling from two days ago by using GUS staining solution and observed under microscope. We saw the blue color emerged along the shoot for seeds pretreated with progesterone 10 μM and 100 μM. No color changed in negative control. This result implies that reporter gene regulates the GUS activity due to introducing progesterone.

Course II: Analysis on the polymorphisms of a human aldehyde dehydrogenase gene

- Day 4th (December 12nd)

  We learned that aldehyde dehidrogenase 2 (ALDH2) is responsible to degrade the acetoaldehyde and release it through respiration in acetic acid, water and CO_2 forms. There are normal (GAA-GAA), hetero (GAA-AAA) and mutant (AAA-AAA) gene expression regarding the presence of active enzyme (glutamic acid) and non active enzyme (lysin).

  Here we were trying to analyze isohair DNA by cutting hair of ourself. After some extraction process we have got template DNA and keep it at low temperature for next day.

- Day 5th (December 13rd)

  We amplified the amount of template DNA by using Plymerase Chain Reaction (PCR). We divided template DNA into two parts for normal and mutant. This PCR product then stored at low temperature for the next day.

- Day 6th (December 14th)

  We have run agarose gel electrophoresis to analyse isohair DNA by using previous PCR product. The result showed that I have **normal** type which means I have active enzyme (GAA) that can degrade alcohol to acetate acid.

Course III: Regulation mechanism of *E.coli* lactose operon

- Day 7th (December 15th)

  I have learned about lactose operon as gene regulation system of procaryotes to response with environmental situation such as availability of energy source (sugar). This experiment aimed to observe induction and repression of *LacZ* under various environmentals condition.

  In the day of this course we just tried to measure enzyme activity of β-galactosidase by incubate sample after treatment. We employed ONPG to diluted crude enzyme and miller units counted by OD600 and UV-Absorbance at 420nm.

- Day 8 (December 16th)

  The last day, we cultivate sample into three parts :

  - Flask no.1 with no addition
  - Flask no.2 with IPTG20 mM
  - Flask no.3 with IPTG20 mM and Glucose 1M

  After measuring cell density and enzyme activity we get result as :

  - Flask no.1 showed lowest activity due to no enzyme activity.
  - Flask no.2 showed the highest enzyme activity because of addition IPTG as inducer of lactose operon.
  - Flask no.3 showed lower activity compared to flask no.2 because of Glucose 1M as repressor of lactose operon.
  - ONPG used here also regulates as catabolic repression.

    Graphical data not shown here.

REPORT ON SHORT COURSE PROGRAM ON ENVIRONMENTAL BIOLOGY

(7-16 December, 2011)

Date of submission: 19th December, 2011

Submitted By-

Md. Shariful Islam
Ph.D student
Division of Environmental Science Development
Faculty of Environmental Earth Science

Submitted To-

Dr. Masaaki Morikawa
Professor
Laboratory of Environmental Molecular Biology
Faculty of Environmental Earth Science,

Hokkaido University, Japan

A Report on the short course Program on Environmental Biology

(7-16 December, 2011)

This short courses on Environmental Biology is very much effective for me as a new learner that includes I) Reporter gene assay using genetically modified *Arabidopsis Thaliana*, II) Detection of Human genetic Polymorphism and III) Regulation mechanisms of Lactose operon in *E. Coli*-Bacterial gene regulation; a response to the change of environmental condition.

In courses no. I, we learned about how to seeding of plant biosensor using genetically modified *Arabidopsis Thaliana*, construction of plant biosensor by introducing artificial gene, Preparation and observation of *A. Thaliana* protoplast (spherical mesophyll cell, cylindrical xylem, starfish shaped trichome etc.) by microscope and finally reporter gene assay using genetically modified *A. Thaliana* with the help of GUS staining solution and stereomicroscope.

In course no. II, we learned about how to extract DNA by PCR and gel-electrophoresis. We are learned about the principle of PCR and gel-electrophoresis. By doing this we can easily find out the alcohol susceptible and degradation mechanism in human body. We here used our hair to analysis of a polymorphisms of a human aldehyde dehydrogenase gene by PCR and gel-electrophoresis.

In course no. III, we learned about the repressor and induction of gene and observed the gene regulation mechanism using Lactose Operon (*lacZ*) under various environmental conditions in prokaryotes (*E. Coli*).

I want to identify gene responsible for arsenic hyperaccumulation in water hyacinth and Japanese fern (*Athyrium yokoscense*). So it is essential to know how to conduct plant gene expression analysis and what is the genetical induction and repression occurs due to the effect of environmental pollutants. Also it is important for me to know how to extract DNA, gene identification, cloning and transformation is done to produce a

suitable transgenic variety for the remediation of environmental contaminants (e.g., Arsenic) from the soils and water bodies. So this short course is very much relevant to me and I also learned about the very little principle and preliminary ideas about the molecular biology experiment.

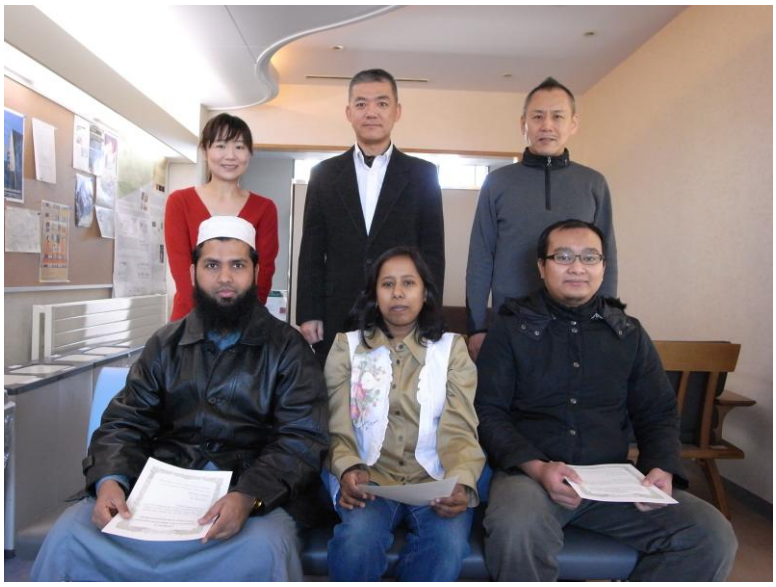
The disadvantages are the duration of this course is very short to understand clearly about the respective field. So time of this course should be extending for better understanding. As an international student, sometimes it is difficult to understand Japanese lecture but I think mostly it was solved by our Sensei for trying to understand ourselves.

All of our teachers try to understand us cordially and friendly environment and we are really grateful to them for their kind effort.

My views about this short course are that it was good and very much helpful for the students who are going to conduct such environmental biology experiment.

Finally I acknowledged to honorable Professor Dr. Masaaki Morikawa, Co-ordinator of this program who arranged such kind of courses for us and thanks to GCOE for funding.

8. 修了式のようす



実習を終えて修了証書を授与されて喜ぶ受講生たちと担当者

前列：左から Md. Shariful Islam さん、Parvin Begum さん、Refi Ikhtiari さん

8. 実習テキスト

2010 IFES-GCOE ラボ実習
環境生物学実習 III

課題１：

−大腸菌の二段増殖とラクトースオペロンの調節機構−

担当：森 川 正 章

地球環境科学研究院　環境分子生物学分野

ホームページ：

http://noah.ees.hokudai.ac.jp/emb/morikawalab/index.html

連絡先：morikawa@ees.hokudai.ac.jp

Phone/Fax: 011-706-2253

地球環境科学研究院 C 棟 709 室

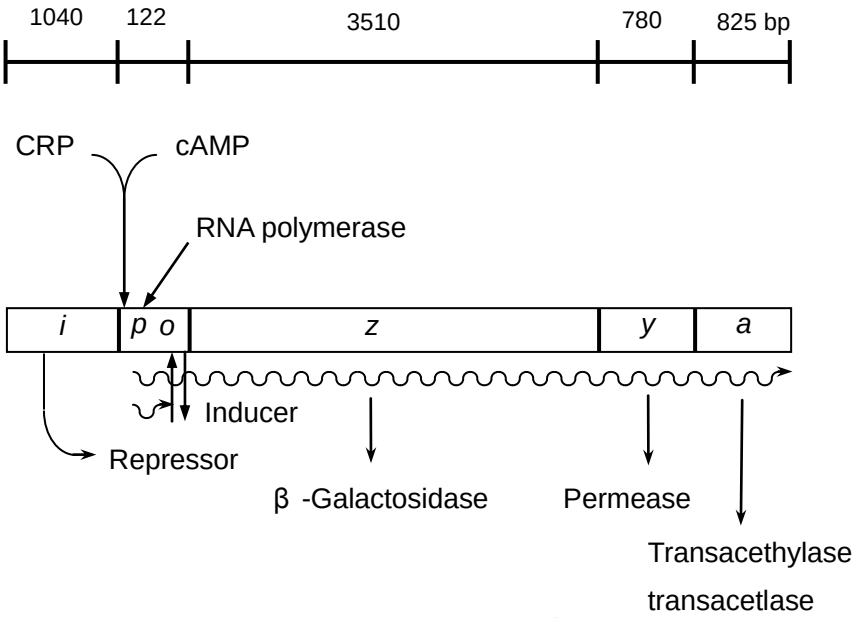
−大腸菌ラクトースオペロンの調節機構−

目的：　多細胞高等生物に比べて，圧倒的にゲノムサイズが小さくまた増殖速度が大きい単細胞微生物は個々の細胞レベルでさまざまな環境に迅速に応答することができる．その背景には不要な遺伝子の発現は通常抑えられ，必要な遺伝子は誘導的に発現する仕組みが備わっている．すなわち微生物が生産する分解酵素の多くは誘導酵素である．その代表例として遺伝学的背景が最も良く理解されている大腸菌

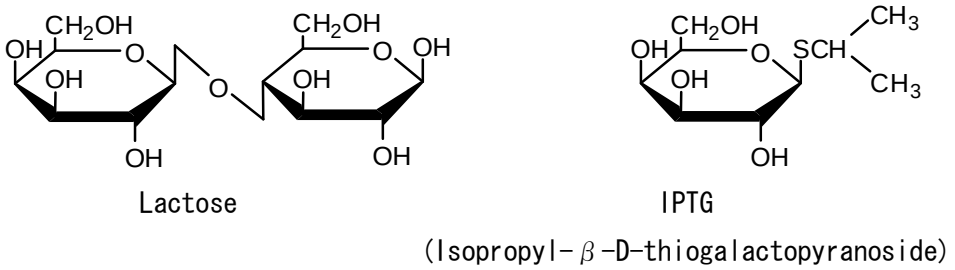
のβ—ガラクトシダーゼ生産（ラクトースオペロン）を取り上げ，遺伝子の発現に関わる誘導因子と抑制因子の特徴について調べ遺伝子の発現調節機構に関する理解を深める．

背景：　F. Jacob と J. L. Monod が 1961 年に提唱したオペロン説は原核微生物の遺伝子発現制御を理解する基本概念として重要である．オペロン説のきっかけとなったのが大腸菌のラクトース利用に関する実験である．ラクトースオペロンには調節遺伝子（*i*）と３つの構造遺伝子（*lacZ, lacY, lacA*）が含まれるが今回の実験ではその中のβ—ガラクトシダーゼの酵素活性を測定することにより遺伝子の発現調節機構を議論する．すなわち，mRNA や酵素の寿命や転写後調節・翻訳後調節については考慮しない．ラクトースオペロンはラクトースの異性体アロラクトースやイソプロピル−β—D-チオガラクトシド（IPTG）などの誘導物質存在下で遺伝子発現（転写）が誘導される．その機構は調節遺伝子（*i* 別名 *lacI*）から常時生産されるリプレッサータンパク質が誘導物質と結合して構造変化を起こし，オペレーター部位（*o*）に結合できなくなるためによる抑制の解除である．すなわち誘導物質がない限り，リプレッサーは負の調節を行っている．
また，遺伝子の転写は RNA ポリメラーゼがプロモーター配列（*p*）を認識して結合することにより開始されるがラクトースオペロンのプロモーター配列は理想的な σ^{70} タイプの配列（-35, -10）と少し異なっているため結合の効率は最大ではないと考えられる．ラクトースオペロン外にコードされる CRP（cAMP レセプタータンパク質, 別名 CAP）は cAMP と複合体を形成しプロモーター領域（-67 付近）に結合し RNA ポリメラーゼの結合を促進する機能をもつ．すなわち，CRP-cAMP は正の調節を担っている．ここで培地中にグルコースが存在すると細胞内に異化代謝産物（カタボライト）である ATP などが蓄積し 3’, 5’-サイクリック AMP（cAMP）濃度の低下を招くのでラクトースオペロンの発現量が抑制される．これがいわゆるカタボライトリプレッションである．
　一方，ラクトース代謝系とは対照的に，グルコースの代謝系は構成的に機能している．

実験概要：
１）グルコースとラクトースが共存した場合，微生物の増殖曲線はどのようになるだろうか？
２）正と負の調節を実際に確かめて見よう．



図．ラクトースオペロンの構造と調節機構



図．誘導物質：Inducer

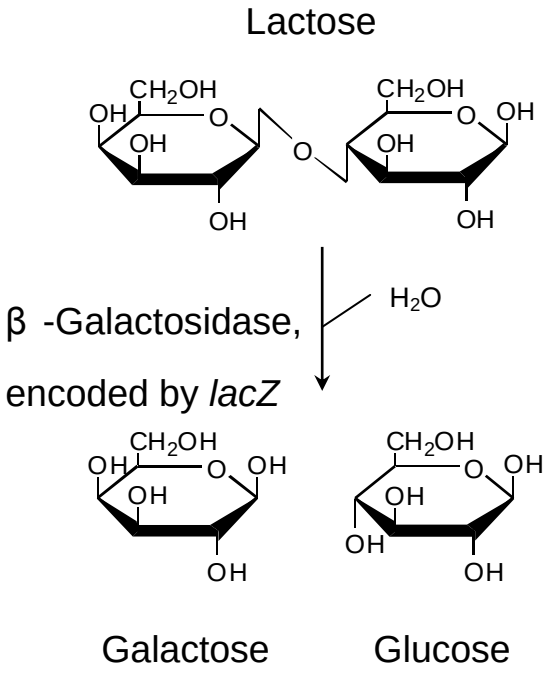


図. β-ガラクトシダーゼの反応（自然界）

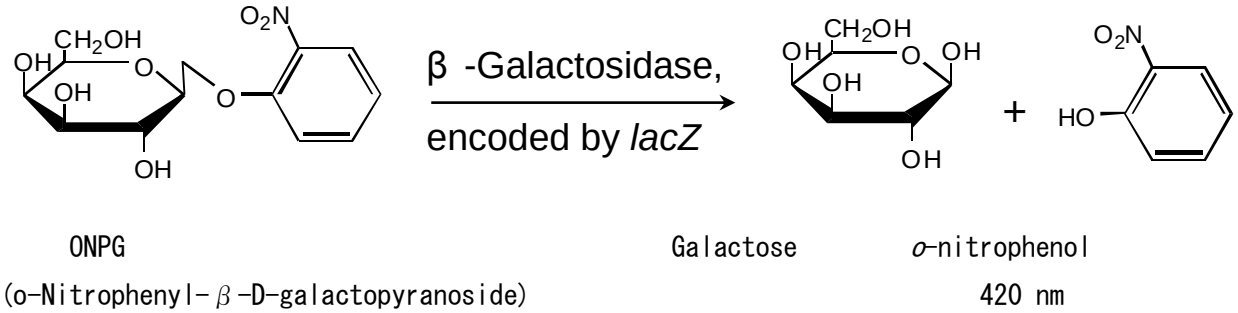


図. β-ガラクトシダーゼの反応（合成基質を用いた場合：実験室）

目的：

種々の条件下での大腸菌の増殖と細胞当たりのβ—ガラクトシダーゼ合成量（活性）の経時変化を調べることにより，上記の転写調節機構について実習する．

準備：

・ 使用菌株　*Escherichia coli* MM294（*thi* ⁻）

・ 培地　完全培地 L

[組成]　（/l）　pH 7.3

Bacto Tryptone	10 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g

・培地　最少培地 M9

[組成]　（/l）

M9 salts;

Na_2HPO_4	6 g
KH_2PO_4	3 g
NaCl	0.5 g
NH_4Cl	1 g

Additives;（おのおの別殺菌）

1 M $MgSO_4$	2 ml
10 mM $CaCl_2$	10 ml
1 mg/ml Thiamine	1 ml

・ 試薬　Z 緩衝液

[組成]　（/l）　pH 7.0

Na_2HPO_4-$12H_2O$	21.48 g（60 mM）
NaH_2PO_4 -H_2O	5.5 g（40 mM）
KCl	0.75 g（10 mM）
$MgSO_4$-$7H_2O$	0.246g（1 mM）

・反応停止液

1M Na_2CO_3

・ 基質

O⁻ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド（ONPG）溶液

[4 g/l in 0.1M Na-phosphate buffer (pH 7.0)]

・前培養

L 培地 100 ml（500 ml フラスコ）に一白金耳植菌し，一晩 37℃で振盪培養したものを前培養液とする．

［実験１］大腸菌の　　増殖曲線

0.04% グルコースおよび 0.2% ラクトースを加えた本培養用の L 培地 50 ml (300 ml フラスコ) に 1%となるよう前培養液を植菌し，37°C で浸とう培養する．60 分以降，10 分おきに培養液 1 ml を試験管にサンプリングし，Z 緩衝液 2 ml を加えて OD_{600} を測定する．測定後，試料は試験管に戻して氷中で保存しておく．OD_{600} 測定値を片対数方眼紙にプロットする．並行して 90, 120, 150, 180 分後のサンプルについてβ—ガラクトシダーゼ合成量（活性）を次頁の要領で測定する．

［実験 2］正と負の調節

今回は本培養の培地として，M9 を基本とした以下の表のものを準備する．

	フラスコ当りの液量（ml）					
	1	2	3	4	5	6
M9 培地（1.25 倍濃度）	1616	16	16	16	16	
カザミノ酸（10%溶液）	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
蒸留水	3.5	2.5	2.1	1.6	2.1	1.6
前培養液	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
グルコース（1M 溶液）	-	-	0.4	0.4	0.4[a]	0.4
cAMP（20mM 溶液）	-	-	-	0.5	-	0.5[b]
IPTG（20mM 溶液）	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

グルコース， cAMP， IPTG は植菌 10 分後に添加する．

この時刻を T = 0（1 以外のフラスコ）として計時を始める．

a) 5 番のフラスコではグルコースは IPTG 添加後 30 分後に添加する．

b) 6 番のフラスコでは cAMP は グルコースと IPTG 添加後 30 分後に添加する．

サンプリング手順

1． 1.25 倍濃度 M9 培地の入ったフラスコに，カザミノ酸，蒸留水を入れた後，前培養液を植菌する．37℃の振盪培養槽にフラスコをセットし 10 分間培養する．

2． 表の指示に従い，フラスコにグルコース, cAMP, IPTG を添加する． T = 0 に第一回目のサンプリングを行う. サンプリング量は 1 ml で, Z 緩衝液を 2 ml 加えて 3 倍希釈する（撹拌）. OD_{600} を測定した後は活性測定まで氷冷しておき，酵素活性測定に使用する．

3． その後，T= 20, 40, 60, 80 分後にサンプリングを行い，上記と同様に処理する．

β—ガラクトシダーゼ活性の測定

Z 緩衝液で希釈した試料にトルエンを一滴加え，直ちにボルテックスミキサーで激しく撹拌した後, 37℃の水浴で 40 分ー60 分間保温する. トルエン臭がほぼなくなったら氷冷する. これを粗酵素原液とする.

粗酵素原液を必要に応じて Z 緩衝液で希釈した液 800 μl（希釈率を D とする）をエッペンドルフチューブに入れ，28℃の恒温槽で 2 分間以上保温する．そこに 160μl の基質

O-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシド（ONPG）溶液を加えて軽く撹拌し，ストップウォッチで計時を開始すると同時に28℃の恒温槽にもどして酵素反応を継続する．

反応産物（*O*-ニトロフェノール）に由来する発色（黄色）が認められたら反応停止液（1 M Na_2CO_3）を 400μl加えて反応を停止すると同時に計時を止めて反応時間を正確に記録する（秒を換算して t min とする）．20 分経過後も発色しない場合は反応を終了する．正確を期すために酵素反応は 2 分間以上行うこと．

「対照試料」としては酵素希釈液に反応停止液を加えたあとに基質を加えたものを用いる．本来は全ての試料に対して対照実験を行うべきであるが，値にほとんど差が出ないので簡便法として各フラスコの T = 0 の試料についてだけ行えば良い．

反応停止後，溶液を遠心分離（10,000 rpm　5 分間）して菌体を沈殿させ，注意深く上澄液 1 ml を小試験管にとり水を 2 ml 加えて 3 倍希釈したものをボルテックスした後 420 nm の吸収（A_{420}）を測定する．ここで A_{420} の値が 0.5 を超えた場合は酵素液を希釈し直して再度反応からやり直す．

酵素活性の計算

酵素活性の簡易的な単位（Miller units）は以下のように定義する．

$$\text{Miller units} = 1{,}000 \times \frac{D \times A_{420} \times 9}{t \times OD_{600} \times 3}$$

ここで，t は反応時間（min），D は希釈率（倍）である．この単位は，非誘導条件下では約 1，誘導条件下では約 1,000〜5,000 程度となるため，相対活性値を比較する場合に便利である．なお，β—ガラクトシダーゼ活性の 1 単位は 一般的に 28℃，pH 7.0 の条件下で 1 分間に 1 nmol の *O*-ニトロフェノールを遊離する酵素量として定義されている．ここで *O*-ニトロフェノールの分子吸光係数（ε）A_{420} = 4,500 cm^{-1} M^{-1} を使えば簡単に単位を換算することができる．

2011 IFES-GCOE

Laboratory Course of Environmental Biology

III

Induction and repression of lactose operon in *E. coli*

--- Bacterial gene regulation; a response to the change of environmental condition ---

Dr. Masaaki Morikawa

Laboratory of Environmental Molecular Biology
Faculty of Environmental Earth Science

http://noah.ees.hokudai.ac.jp/emb/morikawalab/index.html

Contact to : morikawa@ees.hokudai.ac.jp
Phone/Fax: 011-706-2253
Building C, Room 709

Objectives:

In order to live with the smallest costs, microorganisms usually keep many genes under "**repression**" and release it only when they are needed. Latter operation is called as "**induction**" of the gene. Lactose operon is one of the best studied in its gene regulation mechanisms. This experiment aims to observe induction and repression of *lacZ* (one gene in the lactose operon) under various environmental conditions. This experiment is based on an assumption that the amount of transcripts directly reflects on the enzyme activity.

Bacterial strain: *Escherichia coli* MM294 (*thi*-)

Media:

1. M9 minimum medium without carbon source

M9 salts;		(g/l)
	Na_2HPO_4-$7H_2O$	12.8 g
	KH_2PO_4	3 g
	NaCl	0.5 g
	NH_4Cl	1 g
Additives;		(ml/l)
	1 M $MgSO_4$-$7H_2O$	1 ml
	10 mM $CaCl_2$	10 ml
	1 mg/ml Thiamine	1 ml

2. L-broth; (g/l) pH 7.3

Polypeptone	10 g
Yeast extracts	5 g
NaCl	5 g

Reagents:

1. Z buffer; (g/l) pH 7.0

Na_2HPO_4-$7H_2O$	16.1g (60 mM)
NaH_2PO_4-H_2O	5.5 g (40 mM)
KCl	0.75 g (10 mM)
$MgSO_4$-$7H_2O$	0.246g (1 mM)

2. Stopper solution;

1M Na_2CO_3

3. ONPG soln.;

4 g/l in 100 mM phosphate buffer (pH 7.0) [daily prepared]

Methods:

Inoculate a loop of *E. coli* MM294 cells into 100 ml L-broth (500 ml flask) and incubate at 37°C overnight with shaking. This overnight culture is going to be used as pre-culture next day.

Experimental culture flasks contain ingredients as follows;

	Volumes added to flasks (ml)					
	1	2	3	4	5	6
M9 (x1.25 conc.) 16	16	16	16	16	16	
10% Casamino acids	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Distilled water	3.5	2.5	2.1	1.6	2.1	1.6
Pre-culture	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1M Glucose[c]	-	-	0.4	0.4	0.4[a]	0.4
20 mM cAMP[c]	-	-	-	0.5	-	0.5[b]
20 mM IPTG[c]	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

a) In the flask No. 5, glucose is added after 30 min of IPTG addition

b) In the flask No. 6, cAMP is added after 30 min of glucose and IPTG addition

c) In the flasks other than No. 5 and 6, glucose, cAMP, and IPTG are added 10 min after inoculation of pre-culture (This is T=0).

Cultivation and sampling methods

1. Inoculate the pre-culture to flasks containing M9 (x1.25), Casamino acids, and distilled water. Shake the flasks for 10 min at 37°C.
2. Add glucose, cAMP, and IPTG as indicated in the table and mix gently.
3. Take 1 ml culture into a test tube containing 2 ml of Z buffer for the first sample (T = 0) and keep it on ice. The sample will be used for measuring cell density and enzyme activity. The flasks will be kept shaking at 37°C for 60 min.
4. Take 1 ml culture from the flasks afterwards with intervals until 80 min; T = 20, 40, 60, and 80. All the samples should be kept on ice before measuring the cell density and enzyme activity. You may start measuring cell density and enzyme activity as follows after preparing the first sample.

Items to be measured:

1. Cell density

   Take 3 ml sample and measure optical density at 600 nm, OD_{600}.

2. Enzyme activity (β-galactosidase activity)

   1. Add a drop of toluene to each sample (3 ml) and mix vigorously with a vortex mixer. Toluene will loosen the cell membrane so that the substrate (ONPG; o-nitrophenyl- β -D-galactoside) will diffuse into the cells.
   2. Warm the test tubes in a 37°C water bath for 40 to 60 min to evaporate toluene. Then, keep samples on ice before measuring enzyme activity. These samples are called as "Crude enzyme."
   3. Dilute each crude enzyme appropriately with Z-buffer to make 0.8 ml. Remember this dilution rate, D.

4. Warm the diluted crude enzyme (0.8 ml) at 28°C for 2 min.
5. Add 0.16 ml of ONPG (substrate) solution and start measuring time (reaction time; t).
6. The test tube will be allowed to stand at 28°C until coloring light yellow.
7. Stop the reaction by adding 0.4 ml of 1M Na_2CO_3 (stopper) and record the exact reaction time, t. Reaction time must be longer than 2 min. Reaction may be terminated in the case of no coloring occurred even after 20 min incubation.
8. For a blank test, prepare a reaction mixture in which stopper is added before substrate. One blank test is enough for each flask condition.
9. After stopping the reaction, centrifuge the tube at 10,000 g for 5 min or 5,000 g for 20 min to remove the cells from the reaction mixture.
10. Take 1 ml of clear supernatant carefully into a small test tube containing 2 ml of water and measure the absorbance at 420 nm, A_{420}.
11. You may start with 1x dilution of crude enzyme. Higher dilution will be necessary when the absorbance value at 420 nm comes over 0.5. In that case you should start with dilution of the original crude enzyme.

Calculation

One unit of β-galactosidase is defined as follows in this experiment.

$$\text{Units} = 1{,}000 \times \frac{D \times A_{420} \times 9}{t \times OD_{600} \times 3}$$

, where "t" and "D" denote reaction time (min) and dilution rate (folds), respectively. The unit value will be about one under non-induced (repressed) condition and increased to one to five thousands under induced condition.

One unit of β-galactosidase is generally defined as the amount of enzyme releasing one nmol of o-nitrophenol in one minute at 28°C pH7.0. The mol absorption coefficient (ε) of o-nitrophenol is 4,500 cm^{-1} M^{-1} at 420 nm. These units can be easily converted by using ε .

Discussion

Plot enzyme activities vs time on a graph paper. Discuss about the effects of Glucose, cAMP, IPTG on the gene expression. Discuss about the characteristics of induction and catabolite repression and also their relations based on the knowledge of lactose operon.

Preparation of report

A report should be consisted of "Title", "Introduction", "Objective", "Methods", "Results", and "Discussion."

Supplements

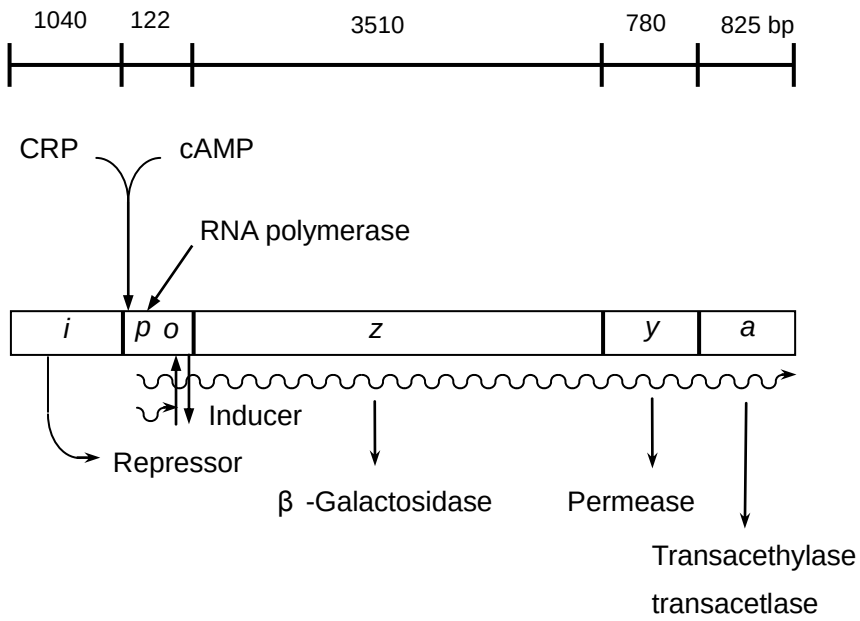


Fig. 1. Structure of lactose operon

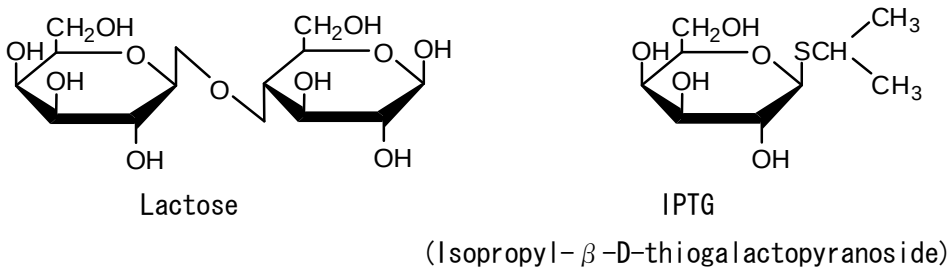


Fig. 2. Structures of inducer for lactose operon

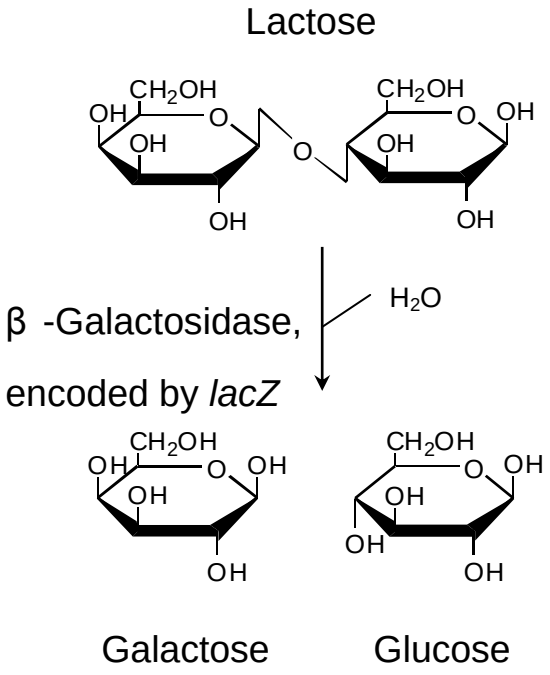


Fig. 3. Reaction of β-galactosidase (products of lacZ) in nature

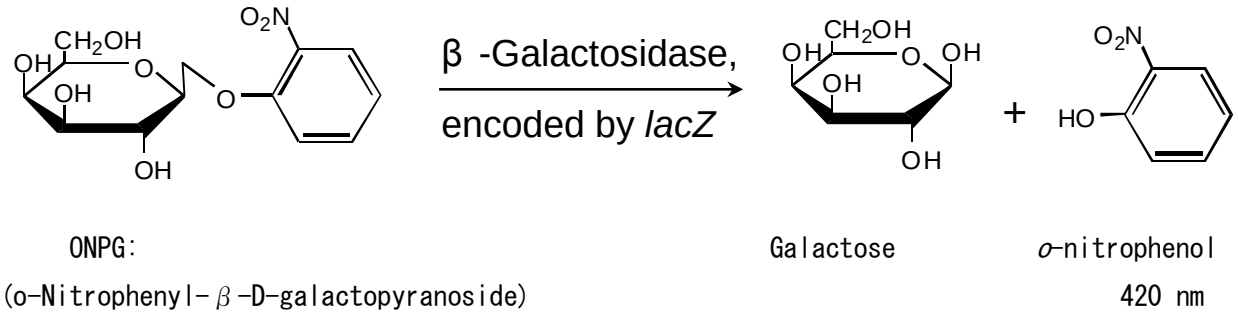


Fig. 4. Reaction of β-galactosidase (products of lacZ) in the laboratory (this time)

環境生物学実習 II 「ヒト遺伝子多型の検出」

副題: ヒト由来アルデヒド脱水素酵素遺伝子多型の検出：SNPs (single nucleotide polymorphisms)

担当：鷲尾　健司

ゲノムプロジェクトとは、一個の生物がもつ遺伝子配列のすべてを決定する研究手法であり、酵母、ショウジョウバエ、シロイヌナズナ、ヒトなどの主要なモデル生物では、既に全ゲノム情報が明らかにされた。決定された遺伝子配列やタンパク質情報は、公的なデータベースで公開され、誰もが自由に利用できる状態にある。このような努力により、我々は生物がもつ遺伝子情報の全貌を知ることが可能になったが､膨大なゲノム情報を使って次に何をするのか？という課題が残されている（ポストゲノム研究)。そのような状況で、最近注目されているものに遺伝子多型がある。

同じヒトであっても、遺伝子配列はまったく同一ではない。個人や人種間での遺伝子配列の微妙な違いが、各人の体質や、薬の効果などに影響するという考えがある。遺伝子の個人差や、人種間差をまとめて遺伝子多型といい、その中でも 1 つの塩基だけが別の塩基に置き換わっているものを SNP (single nucleotide polymorphisms、“エスエヌピー”、もしくは“スニップ”と発音する）と呼ぶ（図 1)。遺伝子多型の約 90%は SNP である。ヒトゲノムの場合、およそ 500~1000 塩基に 1 つの割合で配列の違いが見つかる。SNP は、ヒトゲノムの約 0.1%にあたる 300 万ヶ所くらいに存在すると推定され、SNP の解析を行うことにより、人類の基礎的な理解と共に、新薬開発、法医学、遺伝病などの研究が進むと期待されている。

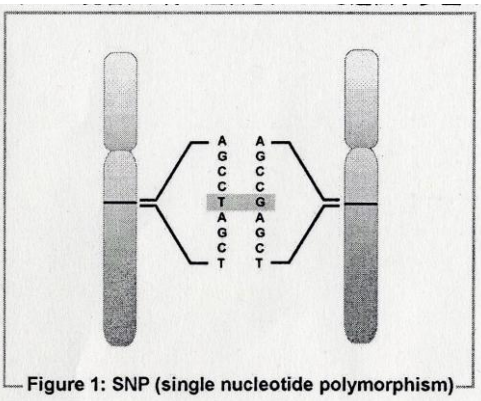


Figure 1: SNP (single nucleotide polymorphism)

SNP を大別すると、遺伝子領域内の cSNP (coding SNP) と、遺伝子領域外に存在する gSNP (genomic SNP) とに分けられる。また cSNP には、遺伝子の機能調節をする rSNP (regulatory SNP) やイントロン上の iSNP (intron SNP) を加える場合もある。その一方で、遺伝子内に SNP を持ちながら、コードするタンパク質のアミノ酸配列に変化のないものを sSNP (silent SNP) と呼ぶ（図 2)。

本実験では、各人の毛髪より DNA を抽出し、それを用いて対立遺伝子特異的合成プライマー (allele specific primer) を利用したゲノム PCR 法により、アルコールを代謝する主要な酵素をコードする aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) 遺伝子の多型を検出する。

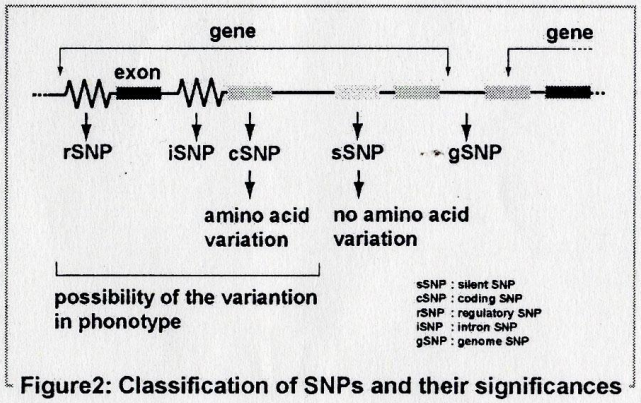


Figure2: Classification of SNPs and their significances

実験スケジュール

1 日目　実験の説明、毛髪からの DNA の抽出

2 日目　PCR 試料の調整、PCR 反応の開始、アルコールパッチテスト

3 日目　アガロースゲル電気泳動法による DNA 断片の分離、エチジウム染色による PCR 産物の検出、実験のまとめと考察

Ⅰ．アルデヒド脱水素酵素 (aldehyde dehydorgenase 2) の遺伝子型の検出

アルデヒド脱水素酵素は、飲酒後のエタノールの代謝産物を分解する酵素である。*ALDH2* 遺伝子はヒトの第 12 番染色体の長腕（12q24.2, q: queue）に位置し、44 kbp にまたがる遺伝子領域にある 13 個のエクソン構造で、ALDH2 酵素を構成する 1 つの subunit (517 amino acids) をコードしている。

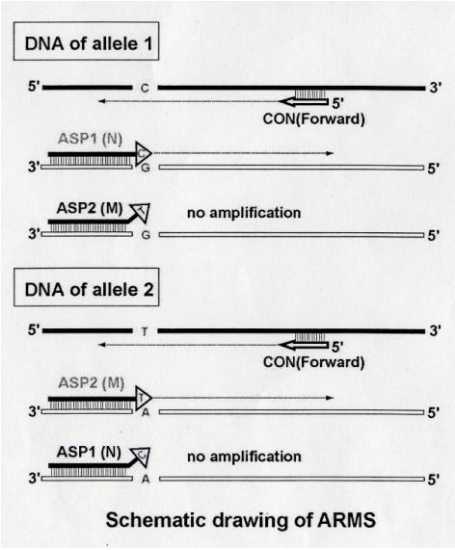
ASP : allele specific primers

ALDH2

Forward
5′-CAAATTACAGGGTCAACTGCT-3′

Reverse/Normal(N)
5′-CCACACTCACAGTTTTCTCTTC-3′

Reverse/Mutated(M)
5′-CCACACTCACAGTTTTCTCTTT-3′



Schematic drawing of ARMS

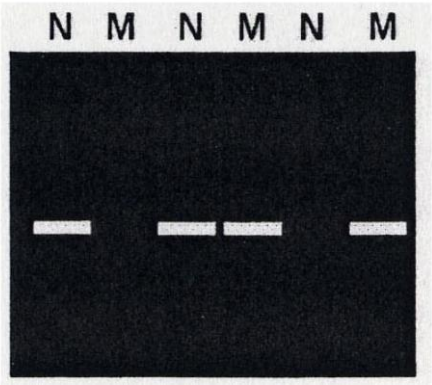
アルコール（エタノール）
↓　←アルコール脱水素酵素（ADH）
アセトアルデヒド
↓　←アルデヒド脱水素酵素（ALDH2）
酢酸
↓
TCA回路による水と二酸化炭素への完全分解と体外への放出

<体内でのアルコールの主要な代謝経路>

個人による ALDH2 活性の欠損は、*ALDH2* 遺伝子の点突然変異によることが分かっている。詳しくは、第 12 エクソンの 114 番目の塩基が G から A に置換しており、その結果、ALDH2 タンパク質の 487 番目のアミノ酸が、グルタミン酸（GAA）からリジン（AAA）に変化している。対立遺伝子（allele）の組み合わせから、正常型ホモ接合体（NN 型）、ヘテロ接合体（NM 型）、変異型ホモ接合体（MM 型）の 3 種類の遺伝子型に区別することができる。

個人における遺伝子型の違いを調べることによって、その人の飲酒に対する潜在的な強さ（アルコール耐性）を判別することが可能となる。NN 型は、一般に言うお酒が飲めるタイプ、NM 型は、顔には出るがまずまず飲めるタイプ、MM 型は、すぐに顔が赤くなり飲めないタイプといえる。

正常型ホモ　ヘテロ　変異型ホモ



実験は、ARMS (amplification refractory mutation system) を基本原理として、*ALDH2* 遺伝子の多型を検出する。ARMS は 2 種類の対立遺伝子特異的合成プライマー (allele specific oligonucleotide primers) を使って PCR を行い、増幅されたプライマーセットの違いから遺伝子型を判別する手法である。

Ⅱ. ニッポンジーン社・ISOHAIR DNA 抽出キットを用いた毛髪 DNA の調整

1) 基本的に 4 人で一つのグループを構成する。(日常の経験から、予め、お酒の強い人、普通の人、とても弱い人の判別を付けておくと良い)
2) 各検体より毛髪を毛根ごと抜き取り、ニッポンジーン社・ISHAIR DNA 抽出キットを用いて DNA を精製する。
3) 毛髪の主要な構成タンパク質である“ケラチン”を、尿素、SDS、proteinase K により分解する。抽出緩衝液中のこれらの試薬により、DNA 分解酵素などの共雑タンパク質も不活性化される。(この時 DNA は、尿素の変性作用により一本鎖構造となる)
4) 強力なタンパク質の変性剤であるフェノールと混和することにより、水溶液中のタンパク質を除去する。変性したタンパク質は遠心分離後、水層とフェノール層の中間に位置する。上層の DNA 画分を回収する時には、この中間層を取り込まないように注意する。
5) エタノール沈殿により DNA を精製する。DNA 溶液に、高濃度の塩存在下 (0.3 M 酢酸ナトリウム) でエタノールを加えると、DNA 分子が凝集するので、遠心操作により沈殿として回収できる。この際、共沈剤 (carrier) として、生物活性のない多糖類 (Ethachinmate) を添加することで、微量な DNA の回収率を上げることができる。

試薬

- Extraction buffer : Tris-HCl (pH 7.5)、SDS、塩類。尿素 (urea) が析出しているときには 55℃の温浴で溶解させる。
- Lysis solution : DTT (酸化防止剤)、界面活性剤
- Enzyme solution : proteinase K (タンパク質分解酵素)
- 3 M sodium acetate (pH 5.2)
- Ethachinmate : エタノール沈殿共沈剤 (グリコーゲンなどの多糖類)
- TE (pH 8.0) : 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、一般的な DNA の溶解試薬
- Phenol/chloroform/isoamyl-alcohol (25 : 24 : 1, v/v)
- Ethanol (70%, 100% solution)

実験手順

1. 検体より毛髪 3~4 本を抜き取り、整髪剤などを除くため 1.5 ml 用の微量遠心チューブに入れた 100% エタノールで軽く洗浄する。
2. 乾燥後、毛髪試料の根本からハサミで 2~3 mm 程度の長さに 2 本切り出し（合計、6~8 本)、1.5 ml 用の微量遠心チューブに確実に入れる
3. 試料の入ったサンプルチューブに、Extraction buffer を 200 µl、Enzyme solution を 5.0 µl、Lysis solution を 8.0 µl 加える。
4. 軽く遠心後、チューブを指ではじいて溶液を混合する。(タッピング操作)

5. 55℃、20 分間インキュベートする。反応時間中、5 分ごとにタッピングをする。試料の温度を下げないように素早く行う。
6. 20 分後、さらに Enzyme solution を 5.0 µl 加えて、タッピングする。

7. 55℃、20 分間インキュベートする。反応時間中、5 分ごとにタッピングをする。
(毛髪はこの段階で完全に溶けて、褐色の溶液となる)
8. Phenol/chloroform/isoamyl-alcohol を 200 µl 加えて、5 分間穏やかに転倒混和する。

9. 12,500 rpm、5 分間、室温の遠心操作で、フェノール層と水層を分離する。この時、変性タンパク質を含む中間層を取らないように注意する。
10. 水層を取り出し、別の新しい 1.5 ml 用の微量遠心チューブに移す。

11. 回収した水層に、3 M sodium acetate を 20 µl、Ethachinmate を 2 µl 加えて、タッピングで混合する。
12. 100% エタノール 400 µl を加えて混合した後、室温に 10 分間、静置する。12,500 rpm、15 分間、室温の遠心操作で凝集した DNA 分子を沈殿させる。
13. 遠心後、マイクロピペットを用いてエタノールを除去する

14. 70% エタノール溶液を 1 ml 添加して、数回穏やかに転倒混和する。

15. 12,500 rpm、5 分間、室温の遠心操作の後、70%エタノール溶液を完全に除去する。この時、沈殿を失わないように注意する。
16. 5~10 分間、真空乾燥。

17. TE (pH 8.0) 溶液を 10 µl 加えて、DNA を溶解する。(鋳型 template DNA)

Ⅲ. PCR 法による遺伝子多型の検出

ARMS による遺伝子多型の検出を行う。抽出した DNA を鋳型にして、2 種類のプライマーセット（正常型、変異型）を用いたゲノム PCR 法により、目的とする遺伝子型を判別する

試薬

- Ex Taq DNA polymerase (5 units/μl)
- 10×PCR buffer for Ex Taq DNA polymerase
- dNTP Mixture (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 各 2.5 mM)
- ddH2O
- Oligonucleotide primer [Forward (FW), Reverse-N (正常型), Reverse-M (変異型)]

実験手順

1. 1 検体あたり 2 本の PCR 用チューブ（正常型、変異型検出用）を用意して、以下の組成の PCR 反応液を調整する。

Template DNA	2.5 μl
10 x PCR buffer	2.5 μl
2.5 mM dNTP mixture	4.0 μl
Primer-1 (Forward, 20 pmol/μl)	1.0 μl
Primer-2 (Reverse-N or -M、20 pmol/μl)	1.0 μl
Ex Taq DNA polymerase	0.25 μl
ddH_2O	13.75 μl
Total	25.0 μl

2. 以下の条件で PCR を行い、目的の遺伝子断片を増幅する。

94℃、 4 分
↓
94℃、30 秒
57℃、60 秒　　35 サイクル
72℃、20 秒
↓
72℃、 3 分

Ⅳ．アガロースゲル電気泳動法による増幅 DNA 断片の確認

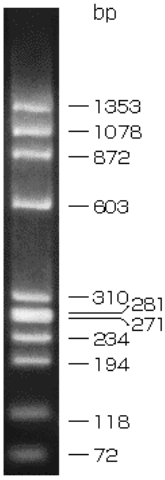
DNA 溶液をアガロースのウェルに入れて一定の電圧をかけると、負に荷電する DNA 分子は、格子状のアガロースゲルの網の目をくぐりながら、マイナスからプラスの方向へと移動する。その際、短い DNA 断片はたやすく網の目をくぐり、長い断片はくぐりにくいので、結果として、移動度に差が生じる。

電気泳動後、分離した DNA 断片をエチジウムブロマイド（EtBr）で染色する。EtBr は、二本鎖 DNA の塩基対の間に入り込み、紫外線を照射すると肉眼で見える 590 nm の蛍光を発するため、ゲル中での DNA の存在が視認できる。

注意！：エチジウムブロマイドは、突然変異誘発剤 (発ガン性物質) であるので、取り扱いには十分に注意する！必ず手袋を着用して実験操作をすること！

試薬

- TaKaRa Agarose LO3
- 1×TBE buffer (89 mM Tris-borate、2 mM EDTA)
- EtBr solution (5 mg/ml)
- 10×Loading buffer
- DNA マーカー（φX174/HaeIII digest: 0.5 μg/μl）
- TE (pH 8.0)
- ddH_2O



実験手順

アガロースゲル（1.5%、40 ml）の作成

1. Agarose LO3、0.6 g を計り取り、100 ml フラスコに入れる。

2. 1×TBE buffer、40 ml をフラスコに加える。(アガロース濃度、1.5%)

3. 液面にマジックインキで印をつける。フラスコの口にラップを被せ、2~3 ヶ所、穴を開ける。
4. 電子レンジで溶かす。様子を見ながら、吹きこぼさないようにする。水分が飛んだらフラスコを取り出して、もとの液面まで蒸留水を補充する。
5. アガロースが完全に溶けたら、フラスコを室温に放置して、手で触れるくらいまで、アガロ

ース溶液を冷ます。

6. 3 mm 厚程度になるように、アガロース溶液をゲルトレイに流し入れる。
(17 レーン用ゲルで、30~40 ml 程度のアガロース溶液が必要)
7. 表面の気泡を取り除いて、コームを刺す。室温に 30 分程度放置してゲルを固化させる。
8. ゲルが完全に固まったらコームを抜いて、泳動槽にセットする。

9. 泳動槽に 1×TBE buffer をゲルの表面が浸る程度入れる。(約 300 ml)

泳動サンプルの準備

1. PCR 産物に 10×Loading buffer を 1/10 量（2.5 μl）加える。

2. 撹拌後、微量遠心機で軽く遠心して、試料をスピンダウンする。

3. DNA マーカーを TE (pH 8.0）で希釈して（0.2~0.5 μg/10 μl)、1/10 量の Loading buffer を加える。

電気泳動

1. マイクロピペットを用いて泳動用試料を、ゲルのウェルにアプライする。1 ウェルあたり 10~12 μl が目安となる。
2. サンプルの端のレーンに、DNA マーカーをアプライする。

3. 100 V の電圧で泳動を開始する。
4. BPB (青い色素）が、ウェルからゲルの 2/3 程度まで移動したら、泳動をとめる。(約 30 分)
5. ゲルを泳動槽から取り出し、エチジウムブロマイド溶液（0.5~1.0 μg/ml）に 10~20 分程度浸して、DNA を染色する。UV トランスイルミネーター上で DNA のバンドを確認した後、ポラロイド写真を撮影する。

注意！：ゲルの撮影の際には遮蔽板、防御メガネを使用し、絶対に肉眼で直接紫外線を見ないこと！

Ⅴ. パッチテストによるアルコール耐性の生理学的判定

アルコールパッチシールの使い方

1. パッチシールについているガーゼに、1 ml 用のピペットマンで 70%エタノールを 4~5 滴たらし、すぐにシールを上腕内側にはる。
2. 7 分間放置した後、シールをはがす。更に 10 分間経過した後に、シールをはった場所の皮膚の色を観察する。(判定中、皮膚をこすらないこと)
3. シールをはった場所の皮膚の色が、赤くならない（＋)、少し赤くなる（±)、真っ赤になる（−)で、アルコールの代謝能力を判定する。

Ⅵ. 実験のまとめ方

レポートの書き方は、一般的なものに準ずる。実験結果は、誰が見ても分かりやすいように各人で工夫をしてまとめる。実験結果や背景となる情報を有効に活用して、独創的で深い考察を心掛けると良い。

作成例)

検体番号	日常の自覚症状	パッチテスト	遺伝子型の判定	出身県・地域	備　考
1					
2					
3					

＊＊

2011 IFES-GCOE ラボ実習
環境生物学実習 I

＊＊

マイクロプロジェクタイル・ボンバードメント法による
タマネギ表皮細胞への遺伝子導入

http://noah.ees.hokudai.ac.jp/emb/ymzklab/yamazaki.html

山崎　健一（地球環境科学研究院・環境分子生物学分野・内線 ４５２２）
ymzk@ees.hokudai.ac.jp

場所： 地球環境科学研究院 C 棟 ７０６ 号室　他

日時：12 月 5 日 ― 9 日（午後 1 時から 6 時頃）

はじめに

この実習では、まず最初にマイクロプロジェクタイル・ボンバードメント法という遺伝子導入法を体験する。これは、植物の様な堅い細胞壁で囲われた細胞への遺伝子導入法として、よく使われる。定量性には欠けるが、定性的な分析には手軽で、優れた方法である。

スケジュール

12 月 5, 6 日（木）マイクロプロジェクタイル・ボンバードメント法によるタマネギ表皮細胞への遺伝子の導入

12 月 7, 8, 9 日（金）植物細胞内での導入遺伝子の発現の蛍光顕微鏡観察

マイクロプロジェクタイル・ボンバードメント法

細胞壁で囲われた植物細胞のような固い組織に DNA を導入する手法として知られている。具体的には、DNA を直径の揃った金の粒子に吸着させ、ヘリウムガスのような不活性のガスの噴射口にセットし、ガスの噴射力により金粒子と共に DNA を細胞の核内に送り込む。そこから遊離した DNA からの転写産物にコードされている緑色蛍光タンパク質を一過的に発現させ、生じたタンパク質の細胞内局在を蛍光顕微鏡を用いて観察する。

実験 1

マイクロプロジェクタイル・ボンバードメント法によるタマネギ表皮細胞への遺伝子の導入

タマネギの表皮は、一層の細胞から成るため、DNA の導入効率をコントロールしやすい。また無色であることから、導入された DNA からの生産物の存在を、色の変化を指標として顕微鏡下で観察しやすい。

1. 金粒子への DNA の吸着：金粒子（Gold powder, Spherical, 1.5-3.0 micron, Aldrich Chem. Co.）5 mg あたり、 100 μl の TE を加え、ソニケーター(Sonifier cell disruptor, Branson Sonic Power Co.) で、Out put = 4-6、5 秒間で懸濁してある。

2. DNA 溶液（1μg/2 μl）に TE を 18 μl、上記金粒子懸濁液を 10 μl を混ぜ、30 μl とする（懸濁液はエッペンチューブの底まで入れるようにする）。

3. 3 M CH_3COONa 3μl、100% エタノール 100 μl を加え、タッピングでよく撹拌し、-20℃ で 15 分間静置する。

4. 10,000 rpm 、4℃で 1 分間遠心し、上清をピペットマン P-200 で吸引して捨てる。

5. 70% エタノールを 300μl 加え、チューブの内側をリンスし、10,000 rpm 、4℃で 1 分間遠心し、上清をピペットマン P-200 で吸引して捨てる。

6. 100 μl の 100% エタノールを加え、沈殿を懸濁する（ボンバードメント用懸濁液の完成）。

7. 遺伝子の導入：遺伝子導入装置（GIE-III IDERA, TANAKA Co., Ltd）を用い遺伝子を導入する。導入を開始する前に、Power スイッチ, Main pump スイッチの順にスイッチを入れ、He ボンベのメインバルブを開けた後、pressure ノズルをひねり、He press gauge が 3 kgf/cm² （一次圧）になるように調節する。Start を押して、ガスの出を確認する（これで準備完了）。次に、以下の操作を繰り返し、タマネギに遺伝子を導入する。

8. 1.5 cm 四方ぐらいに切ったタマネギ（タマネギはなるべく内側の方を用い、4 個用意する）を、薄皮が上になるように 1 つのシャーレに 2 個ずつ入れ、遺伝子銃の台に置く(上から5段目が最適)。 ボンバードメント用懸濁液をソニケートし（Output = 4-6、5 秒間)、5 μl ずつ懸濁液をソケットの中央に入れる。

9. ソケットを装着し、蓋を閉める。3 way valve を vacuum にし、vacuum gauge が 600 mmHg になったところで 3 way valve を off にする。start を押し、バルブを解放して打つ（1 種類のサンプルについて、2 個のタマネギに 1 回ずつ打ち込む、time は 0.025 秒間が最適、きちんと撃てていれば、数分後にあざの様なものがタマネギの表面にあらわれる）。

10. タマネギは、シャーレごとアルミ箔で包んだ後、25℃ で一晩静置。

注）ソニケーターの使用について：DNA のコンタミが起こらないよう、以下の要領でソニケーションを行って DNA を分解除去する。ソニケーターを超純水で濡らしたキムワイプで拭く。超純水を入れたビーカーにソニケーターを浸け、out put = 4-6 で 5 秒間ソニケートし、洗浄。エタノールで拭き、乾燥した後、ソニケーションを行う。ソニケーション後、再度、超純水で洗浄する。

実験 2

タマネギ表皮細胞に導入された遺伝子の発現解析

1. 観察：タマネギの薄皮をピンセットではぎ取り、スライドガラスにのせ、超純水を滴下した後、カバーガラスをかける。（タマネギが丸まったり、気泡が入らないようにする）これを蛍光顕微鏡で観察する。

****

2011 IFES-GCOE
Laboratory Course of Environmental Biology I

****

Introduction of Gene into epidermal cells of onion by micro projectile bombardment

http://noah.ees.hokudai.ac.jp/emb/ymzklab/yamazaki.html

Ken-ichi Yamazaki（Graduate School of Env Earth Sci ・ Ext 4522） ymzk@ees.hokudai.ac.jp

Lab：Graduate School of Env Earth Sci

Dec 5－9（13：00～18：00）

Schedule

Dec 5, 6
Introduction of Gene into epidermal cells of onion by micro projectile bombardment

Dec 7, 8, 9
Observation of GFP in plant cells under fluorescent microscope

Experiment 1

Introduction of Gene into epidermal cells of onion by micro projectile bombardment

1. Sonication of gold particle (Gold powder, Spherical, 1.5-3.0 micron, Aldrich Chem. Co.). Suspend 5 mg of gold particle in 100 μl of TE, and sonicate them (Sonifier cell disruptor, Branson Sonic Power Co.) at Out put = 4-6 for 5 sec.

2. Add 18 μl of TE to DNA (1 μg/2 μl) . Add suspension of gold particle 10 μl to the DNA solution.

3. Add 3 M CH_3COONa (3 μl) and 100% Ethanol (100 μl) to the above solution. Mix and incubate the solution at -20℃ for 15 min.

4. Centrifuge the solution at 10,000 rpm at 4℃ for 1 min. Remove upper solution by using pipetteman P-200.

5. Rinse inside of centrifuge tube with 300 μl of 70% ethanol. Centrifuge the tube at 10,000 rpm at 4℃ for 1 min again. Remove upper solution by using pipetteman P-200.

6. Add 100 μl of 100% ethanol to gold particle fixed with DNA on their surface.

7. Power switch and Main pump switch of bombardment machine (GIE-III IDERA, TANAKA Co., Ltd) are turned on. Valve of He steel bottle is opened. Open pressure nozzle until He press gauge show 3 kgf/cm^2.

8. Set four segments of onion (1.5 cm x 1.5 cm) in a petri dish. Place the petri dish on the shelf of bombardment machine. Sonicate the gold particle fixed with DNA on their surface at Output = 4-6 for 5 sec. Put 5 μl of the suspension at the center of socket of the machine.

9. Load the socket and close the chamber of the machine. Turn 3 way valve to vacuum and turn off 3 way valve when vacuum gauge showed 600 mmHg. Push start bouton to release He. Time required for bombardment would be recorded as 0.025 sec.

10. Segments of onion in a petri dish should be kept in incubator at 25℃ for 12 h covered with aluminum foil.

Experiment 2

Observation of GFP in plant cells under fluorescence microscope

1. Pale epidermal cell layer by using forceps, mount them onto slide glass, add a drop of water, and cover them with a cover glass.
2. Observe signals of GFP under fluorescent microscope.