

## [09] 遺伝子導入の効率の向上

安部春希, 奥山ちひろ, 小川愛祐美, 佐々木咲理, ○松坂恵奈, †遠藤金吾  
(秋田県立秋田高等学校理数科遺伝子班)

### 【目的】

バイオテクノロジーの是非を判断する上で重要である遺伝子組換え技術を理解するには、教育現場での体験が有効であるが、高効率の遺伝子導入法は高価な機器が必要であり、教育現場での活用は進んでいない。大腸菌の遺伝子導入法であるエレクトロポレーション法の代替として電子レンジのマイクロ波の照射を行う、または、塩化カルシウム法<sup>[1][2]</sup>において細胞膜を透過または穴をあける物質を追加することで、簡単に高効率な遺伝子導入法を確立することが本研究の目的である。

### 【材料および方法】

37℃で一晩培養した大腸菌(*Escherichia coli*)DH5a株にプラスミドpKY1292を加え、電子レンジでマイクロ波を0,5,10,15秒照射した。塩化カルシウム(CaCl<sub>2</sub>)50 µg/mLまたはグリセリン<sup>[3]</sup>15.0%、ポリエチレングリコール(PEG)<sup>[4]</sup>10.0%、ポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル(POER)25.0 mM、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(LAS)1.1 mM、サーファクチン<sup>[5]</sup>15.6~46.2 µg/mLで大腸菌を処理しプラスミドを加えた。LB寒天培地、アンピシリン含有LB寒天培地にまき、37℃で一晩培養し、生育したコロニー数を数え、遺伝子導入の効率=アンピシリン含有LB寒天培地でのコロニー数÷LB寒天培地でのコロニー数を求めた。同様に、遠心分離器を使用しない実験も検証した。

### 【結果】

電子レンジのマイクロ波の照射ではどの秒数でもLB寒天培地にコロニーが見られたが、アンピシリン含有LB寒天培地にはコロニーが見られなかった。CaCl<sub>2</sub>にグリセリン、PEG、POER、LASを添加するとCaCl<sub>2</sub>単独処理に比べ、遺伝子導入の効率は低下した。CaCl<sub>2</sub>にサーファクチン30.0 µg/mL添加するとCaCl<sub>2</sub>単独処理に比べ、遺伝子導入の効率は1.1倍となった。遠心を行わない実験では、アンピシリン含有LB寒天培地にコロニーが見られた。

### 【考察】

電子レンジのマイクロ波では遺伝子導入は行えず、グリセリン、PEG、POER、LASには遺伝子導入の効率を向上させる効果はなかった。CaCl<sub>2</sub>がDNAに対する細胞膜の透過性を高める際に関与しているカルシウムイオン(Ca<sup>2+</sup>)の働きを阻害していると考えた。CaCl<sub>2</sub>にサーファクチン30.0 µg/mLとなるように添加した実験で、CaCl<sub>2</sub>がサーファクチンを、またはサーファクチンがCaCl<sub>2</sub>の機能を促進していると考えたが、再現性に乏しく濃度によって差があることから最適な濃度があると考えた。また、遠心分離器を用いず遺伝子導入ができる実験キットの開発の可能性が示唆された。

### 【参考文献】

- [1]M Mandel,A Higa.Calcium-dependent bacteriophage DNA infection.*J Mol Biol.*1970,53(1):159-62.
- [2]D Hanahan.Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.*J Mol Biol.* 1983;166(4):557-80.
- [3]中村信雄, ホタテ貝柱からのグリセリン筋の製法、遺伝1999年53巻7号 : p76-79.
- [4]山本義治, 小保方潤一, ポリエチレングリコールによる大腸菌の形質転換法. 生化学.1990 ; 62(12):p1513-4.
- [5]Imura T, Surface Properties and Practical Applications of Biobased Surfactants. *Acc. Mater. Surf. Res.* 2019;4(2),p81-6.