

## 目次

1. 遺伝子操作基礎技術
  - 1.1 組換え DNA の作成
  - 1.2 大腸菌の形質転換
    - 1.2.1 Hanahan 法
    - 1.2.2 エレクトロポレーション法
  - 1.3 プラミド DNA の精製
  - 1.4 DNA の切りつめ
    - 1.4.1 エクソIII法
    - 1.4.2 PCR 法
  - 1.5 酵母の染色体 DNA の調製
  - 1.6 酵母のトータル RNA の調製
  - 1.7 サザンハイブリダイゼーション
  - 1.8 ノーザンハイブリダイゼーション
2. 大腸菌の遺伝子操作
 

緒言

  - 2.1 染色体 DNA の調製
  - 2.2 RNA の調製
  - 2.3 遺伝子破壊または遺伝子置換細菌の作成
  - 2.4 タンパク質の解析 (マキシセル法)
    - 2.4.1 RI 標識
    - 2.4.2 SDS-PAGE
    - 2.4.3 フルオログラフィー
  - 2.5 大腸菌ゲノムデータベース
    - 2.5.1 大腸菌染色体遺伝子マッピング用メンブレン
    - 2.5.2 大腸菌ゲノムデータベース
3. 酵母の遺伝子操作
 

緒言

  - 3.1 生活史
    - 3.1.1 細胞分裂周期
    - 3.1.2 性結合
    - 3.1.3 減数分裂と胞子形成
  - 3.2 変異株の取得と遺伝解析
    - 3.2.1 変異株の選別
    - 3.2.2 優性・劣性試験
    - 3.2.3 四分子解析
    - 3.2.4 相補試験
  - 3.3 遺伝子の単離と解析
    - 3.3.1 酵母ベクター
    - 3.3.2 遺伝子バンクによる形質転換
    - 3.3.3 形質転換酵母からのプラスミド DNA の回収
    - 3.3.4 染色体上の遺伝子の破壊
4. 植物の遺伝子操作
 

緒言

  - 4.1 組織培養法
    - 4.1.1 タバコの懸濁培養
    - 4.1.2 シロイヌナズナ根組織からの植物体の再生系
  - 4.2 染色体 DNA の調製
    - 4.2.1 CTAB 法
    - 4.2.2 フェノール法
  - 4.3 RNA の調製
    - 4.3.1 トータル RNA の抽出
    - 4.3.2 Oligotex-dT30 を用いた Poly(A)<sup>+</sup>mRNA の精製

## 大学院におけるバイオサイエンス先端教育に関する実技教育システムの研究

遺伝子実験施設	新見	理 学 部	森川	弘道
工 学 部	宮川	生物生産学部	香掛	和弘
生物生産学部	池上	晋	山下	一郎

### プロジェクトの概要

自然科学における学問内容の高度化は近年著しく加速され、特にバイオサイエンスの領域における進歩は日進月歩の観がある。このような研究速度の

加速化と内容の高度化に対応する大学院教育、特に博士課程前期におけるカリキュラムは、従前の各専攻における縦割り教育では対応できない内容も考えられ、あるいは専攻を横断する教育

協力が効率化のためにも必要と考えられる。これらの点は平成元年四月の広島大学将来構想検討委員会答申にも指摘され、また昨年度、教育研究学内特別経費による「大学院におけるバイオサイエンス先端教育に関する基礎的研究」プロジェクトで提言した問題である。そのプロジェクトで提言した実技教育システムの実行案を具体化すべく、大学院博士課程前期在学者を対象として理学、工学、生物圏研究科の分野における先端バイオサイエンス技術に関する実技講習会を開催することにより、各研究科内での教育枠を越える基礎先

端技術の実技教育システムを模索することを目的とした。講習会では細菌から動物までを幅広く対象とし、遺伝子操作技術及び分子生物学的研究法の習得を達成する。そのため、講師は三研究科より数名ずつそれぞれの分野で実績のある教官を選出し(プロジェクト構成員は各分野担当の代表者)、実験カリキュラムの立案と分担指導者を担当、更にそれに基づき実習・実験書を作成し、学内、学外で利用することを計画した。実験内容は基礎コースとアドバンスコースの二本立てとする。

成果の概要

一、実習・実験書作成を前提とし、指導上の留意点等を実験書に反映させるために、二種の実技講習会を実施した。

第一回目は、夏期休暇に入った七月二十二日より一週間、遺伝子実験施設を使用して基礎実験講習会を実施した。講師は遺伝子実験施設の新任治教授及び山下一郎助教授、参加者は理、医、歯、生物生産学部及び原医研に所属の教官、院生を主体とした三十三名、講習内容は、組換えDNAの作成、E. coli コンピテントセルの作成、DNAの切りつめ法、プラスミドDNAの精製、サザンブ

- 4.4 発現ベクター
  - 4.4.1 グルクロニダーゼ (GUS) 遺伝子
  - 4.4.2 ルシフェラーゼ遺伝子
  - 4.4.3 カナマイシン耐性遺伝子
  - 4.4.4 ハイグロマイシン耐性遺伝子
  - 4.4.5 クロラムフェニコール耐性遺伝子
  - 4.4.6 ビアラホス耐性遺伝子
- 4.5 遺伝子導入
  - 4.5.1 アグロバクテリウム法
  - 4.5.2 エレクトロポレーション法
  - 4.5.3 パーティクルガン法
- 4.6 導入した遺伝子の発現アッセイ
  - 4.6.1  $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子の発現アッセイ
  - 4.6.2 ルシフェラーゼ遺伝子の発現アッセイ
  - 4.6.3 カナマイシン耐性遺伝子の発現アッセイ
  - 4.6.4 ハイグロマイシン耐性遺伝子の発現アッセイ
  - 4.6.5 クロラムフェニコール耐性遺伝子の発現アッセイ
  - 4.6.6 ビアラホス耐性遺伝子の発現アッセイ

5. 動物の遺伝子操作

- 緒言
- 5.1 染色体 DNA の調製
- 5.2 RNA の調製
- 5.3 発現ベクター
- 5.4 遺伝子導入
- 5.5 導入した遺伝子の発現アッセイ
  - 5.5.1 CATアッセイ法
  - 5.5.2 lacZによる発色を検出する方法

6. 分子生物学分野における発展技術

- 6.1 転写開始点の決定
  - 6.1.1 SIマッピング法
  - 6.1.2 プライマー伸長法
- 6.2 タンパク質の検出
  - 6.2.1  $\beta$ -ガラクトシダーゼ融合遺伝子を用いる遺伝子産物の検出
  - 6.2.2 融合タンパク質の精製
  - 6.2.3 抗体作製
    - 6.2.3.1 ポリクローナル抗体の作製
    - 6.2.3.2 モノクローナル抗体の作製
  - 6.2.4 ウェスタンブロッティング
  - 6.2.5 免疫沈降法
  - 6.2.6 免疫染色法
- 6.3 染色体 DNA の分離 (パルスフィールド電気泳動)
- 6.4 染色体 DNA のライブラリーの作製
- 6.5 cDNA ライブラリーの作成
- 6.6 無細胞系メッセンジャーRNA 合成
- 6.7 無細胞系タンパク質合成
- 6.8 イトマキヒトデ卵母細胞への RNA のマイクロインジェクション
- 6.9 in situ ハイブリダイゼーション
- 6.10 DNA 塩基配列決定法
- 6.11 DDBJ (DNA Data Bank of Japan) のデータベースのオンライン利用の手引き
  - 6.11.1 DDBJ の紹介
  - 6.11.2 広島大学遺伝子実験施設から DDBJ を利用する方法
  - 6.11.3 データベースを利用する方法

ロットハイブリダイゼーション、酵母の全RNAの単離、DNAシークエンシング・データバンクの説明であった。第二回目は八月二十六日より一週間、遺伝子実験施設を使用してアドバンスドコースの講習会を実施、講師は工学部の土屋英子助教授及び遺伝子実験施設の山下一郎助教授、講習内容は、ウェスタンブロット法、DNAシークエンス、シークエンスラダーの解析であり、参加者は理、医、歯、生物生産学部の教官、院生九名であった。

いずれの講習会においても、参加者は極めて熱心で、熱気のもる講習会となった。終了後の感想も極めて良好であり、さらに種々の内容を持つ講習会開催の希望が強かった。二、実技講習会等の経験や受講者のアンケート等を基に、プロジェクト構成員を代表者とした実験書作製に取り組んだ。

テキストの内容範囲は、(一)遺伝子操作基礎技術、(二)大腸菌の遺伝子操作、以下(三)酵母、(四)植物、(五)動物の遺伝子操作、(六)分子生物学分野における発展技術とした。表現は出来る限り図式化して反復の説明は省略し、机上に置いて図をみながら実験が出来るようにした。また実験の原理、留意点、実験を成功させる為のノウハウ等を記述することとし、二五三ページからなる実験書が完成した。

実験書をここに示すことが出来ないで参考として目次の全てをここに掲載する。

先に述べた如く実験書は、実験台の上において参考にしながら実験ができるように特に工夫した形式を試みている。

初版を基に更に年々改良を加え、広島大学のオリジナル実験書として活用いただけることを目指している。内容に関係のある皆様方からのご意見、ご指導をお願いする次第である。最後に、貴重な時間を本実験書作製の為に割愛していただいた教官、院生の方々にこの紙面を借りて改めてお礼を申し上げます。