

バイオ実験キット

Dr.ジーン 5 酵素特性学習キット ピッカジーン®

取扱説明書

I. 本キットについて	2
II. キット内容の確認	3
III. 実験準備	3
IV. プロトコル(実験操作)	4
V. 実験の失敗例	5
VI. pH 変化による発光色の変化について	5
VII. 参考文献	5
VIII. 使用上の注意	6



ホタルの酵素(ルシフェラーゼ)による発光

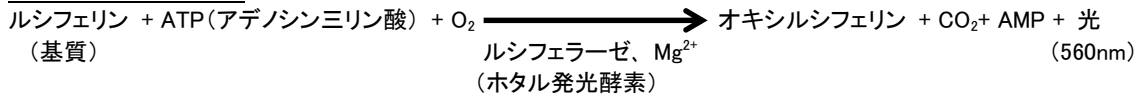
I. 本キットについて

【生命を作るタンパク質・遺伝子を理解するために】

誰もがあらゆる情報媒体から“遺伝子”や“細胞”という言葉を目にするようになり、タンパク質・遺伝子・細胞を中心とするライフサイエンスの基礎は、文系、理系を問わず、避けては通れない学問分野になっています。

人間・動物・昆虫・植物等の全ての生物は、遺伝情報を DNA という形で保存しています。生体における代謝活動では、これらの情報が読み取られてタンパク質が合成され、活用されます。Dr.ジーン 3～5 は、身近な生物発光(ホタルの発光(※1))を利用して、このような生命情報の流れの基本であるセントラルドグマ(※2)を理解するための教材として、高等学校、大学一般教養向けに製作されました。

※1 ホタルの発光反応



※2 セントラルドグマ

1958年にフランス・クリックが提唱した分子生物学の一般原理。DNA 塩基配列による情報を RNA に転写し、その RNA からタンパク質が合成される流れのことで、生体内では、その逆は起こらないとされている。ただし、RNA ウィルス(レトロウィルス等)のように、RNA を遺伝情報とし、その RNA から DNA を作り出す例外も存在する。

【Dr.ジーン 5 について】

Dr.ジーン 5 は、酵素活性の特性を理解するための実験キットです。測定機器を使用せずに、ホタルルシフェラーゼを利用して酵素反応を視覚で確認します。ホタルの発光反応は、前述の通り、基質であるルシフェリンが ATP、O₂、Mg²⁺の存在下で、ルシフェラーゼの関与によって、オキシルシフェリンへと酸化される際に放出されるエネルギーが光として現れる現象です。

酵素活性は、様々な要因によりその強弱が決定されますが、特に、温度、pH 等が至適範囲から外れた場合に大きく変化します。本キットでは、pH や温度の違いによる酵素活性の変化についての理解を深めることが出来ます。本キットで使用するルシフェラーゼは、pH の変化によって、特徴的な活性変化をもたらします。通常、至適 pH(7.6 近辺)においては 560nm の黄緑色の光を発しますが、pH を下げることで、その色は赤色に近づきます。また、熱を加えることで発光に赤味が差し、さらに温度を上げると酵素が失活して消光します。

「Dr.ジーン 5」は、酵素液と緩衝液を用いて、反応条件(pH、温度)を変えることにより酵素活性が変化することを確認するシステムであり、酵素活性の特性を実際に体験するための実験キットになっています。

II. キット内容の確認

- ☞必ず「使用上の注意(8 ページ)」を読んでから作業を開始して下さい。
- ☞キット開封後、数量を確認して下さい。本キットには、6 班分(12 試験分:1 班あたり 2 回実験が出来る構成)の試薬・実験器具が含まれています。スポイトは、各試薬につき 2 本ずつ(4 本/班)です。同一の試薬は、1 本のスポイトで取り扱って下さい。

品名	容量	数量	保存	チェック
ルシフェラーゼ酵素液 (黄色チューブ)	250 μ l	36 本	-20°C	<input type="checkbox"/>
緩衝液 (青色チューブ)	125 μ l	12 本	-20°C	<input type="checkbox"/>
蒸留水 A (紫チューブ)	125 μ l	12 本	-20°C	<input type="checkbox"/>
蒸留水 B (赤色チューブ)	250 μ l	24 本	-20°C	<input type="checkbox"/>
ルシフェラーゼ酵素発光試薬/ピッカジーン(緑色チューブ)	250 μ l	36 本	-20°C	<input type="checkbox"/>
試験管		36 本	室温	<input type="checkbox"/>
スポイト		48 本	室温	<input type="checkbox"/>

<キット構成以外に必要なもの>

- ・発泡スチロールの箱に入れた氷
- ・廃棄物入れ(プラスチック用、可燃物用)
- ・滅菌用 70%エタノール
- ・ティッシュまたはガーゼ
- ・油性ペン
- ・湯煎
- ・温度計(100°Cまで測れるもの)
- ・タイマー

III. 実験準備

☞実験準備は先生が行って下さい。

(1) 試薬の確認

班毎に試薬を分け、試薬の種類を確認します。試薬は微量のため、チューブの蓋裏に付着している場合がありますので、使用前に試薬がチューブの底に集まっていることを確認して下さい。

(2) 試薬の氷冷

“ルシフェラーゼ酵素液”、“ルシフェラーゼ酵素発光試薬/ピッカジーン”を氷の中に深く差し込み、使用時まで氷冷します。氷は、製氷機などで作製した粒の細かいものを使用して下さい。粒の大きい氷を使用した場合、チューブとの接触面が小さくなり、冷却効率が悪くなります。十分に冷却されていない酵素は、比較的簡単に失活します。

(3) 備品の準備

油性ペンを用いて、各々のスポイトに使用する試薬名を記入します。蒸留水 A、B は、同じスポイトを使用して下さい。

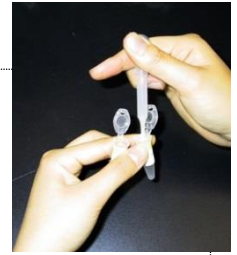
班毎の試薬のチェック(保存条件は、実験中における保存条件を示します)

班	年	月	日	品名	容量	数量	保存	チェック
				ルシフェラーゼ酵素液 (黄色チューブ)	250 μ l	6 本	氷中	<input type="checkbox"/>
				緩衝液 (青色チューブ)	125 μ l	2 本	室温	<input type="checkbox"/>
				蒸留水 A (紫チューブ)	125 μ l	2 本	室温	<input type="checkbox"/>
				蒸留水 B (赤色チューブ)	250 μ l	4 本	室温	<input type="checkbox"/>
				ルシフェラーゼ酵素発光試薬/ピッカジーン(緑色チューブ)	250 μ l	6 本	氷中	<input type="checkbox"/>
				試験管		6 本	室温	<input type="checkbox"/>
				スポイト		8 本	室温	<input type="checkbox"/>

※ 1 μ l=0.001ml

IV. プロトコル(実験操作)

- ☞ 実験者は全員、石鹸で手を洗って下さい。
- ☞ ティッシュやガーゼ等に滅菌用 70%エタノールを含ませ、実験台を拭きます。



<p>① pH による 酵素活性の 変化</p>	<p>① ルシフェラーゼ酵素液(黄色チューブ) 250 μl(全量)をスポイトで取り、試験管に入れます。これを 2 本準備し、試験管に A、B と印を付けます。</p> <p>② 蒸留水 A(紫色チューブ) 125 μl(全量)をスポイトで取り、試験管 A に入れます。</p> <p>③ 緩衝液(青色チューブ) 125 μl(全量)をスポイトで取って加え、試験管を軽く振って攪拌します。</p> <p>② 蒸留水 B(赤色チューブ) 250 μl(全量)をスポイトで取り、試験管 B に入れます。</p> <p>③ 試験管を軽く振って攪拌します。 (緩衝液は加えません)</p> <p>④ 室内を暗くするか、外側に黒い模造紙を貼った箱の中に試験管を移します。</p> <p>⑤ ルシフェラーゼ酵素発光試薬(緑色チューブ) 250 μl(全量)をスポイトで取り、それぞれの試験管に加えて、発光を観察します。</p> 
<p>② 温度による 酵素活性の 変化</p>	<p>☞ 発光を観察する際は、実験室を暗くして下さい。</p> <p>① ルシフェラーゼ酵素液(黄色チューブ) 250 μl(全量)をスポイトで取り、試験管に入れます。</p> <p>② ルシフェラーゼ酵素発光試薬(緑色チューブ) 250 μl(全量)をスポイトで取って加え、発光を観察します(約 10 秒)。</p> <p>③ 試験管を 70°C の湯煎に正確に 20 秒間入れ、軽くチューブを振ります。発光を観察します(約 10 秒)。</p> <p>④ 試験管を水中に 50 秒間入れた後、軽くチューブを振り、発光を観察します。</p>

【観察のポイント】

i) 発光色の変化

反応液が酸性に傾いたり、温度が上がることで赤色に変化します。

ii) 発光量の変化

至適 pH から外れることで酵素活性が低下し、エネルギーの発散が低下するため、発光量が低くなります。また、温度の上昇とともに発光量は下がり、最終的には酵素が変性するため、発光なくなります。温度変化による発光量の低下・赤変は、タンパク質の変性が起きない限りは可逆的な反応であるため、室温に戻すことで、元の発光を得ることが出来ます。

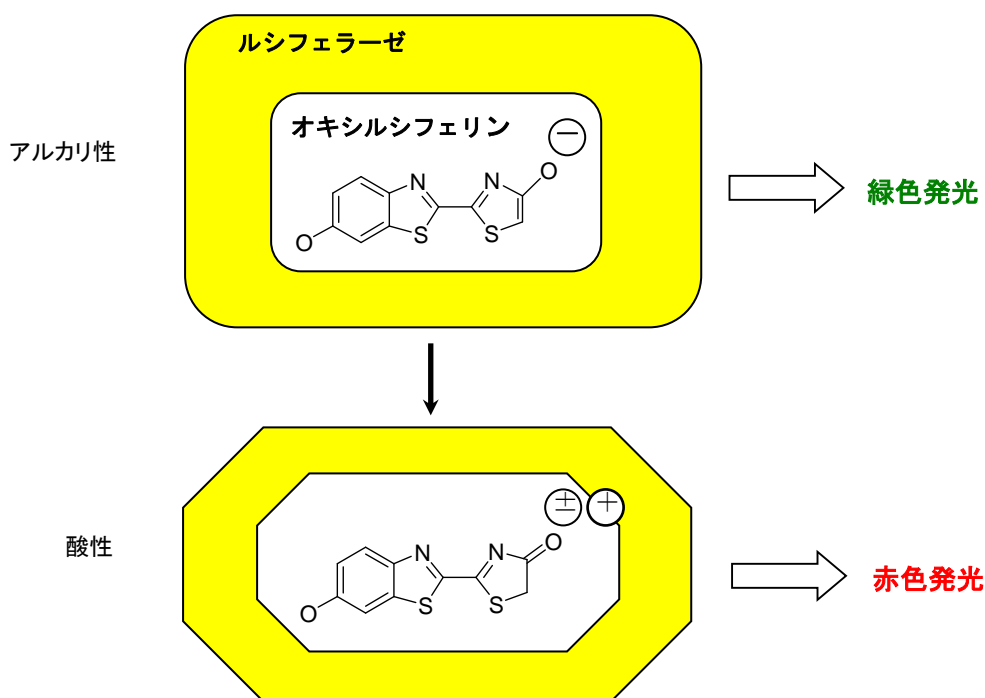
V. 実験の失敗例

発光が確認できなかった場合、次のような原因が考えられます。

- ・試験管の振り(攪拌)が強すぎた場合、酵素が失活することがあります。
- ・試薬が室温に戻っていない場合、低温が原因で、酵素が働かないことがあります。
- ・ルシフェラーゼ酵素液、ルシフェラーゼ酵素発光試薬を長時間室温に放置した場合、もしくは何らかの理由により熱が加えられた場合、酵素が失活することがあります。
- ・試験管を振った際の攪拌が強すぎた場合、酵素が失活することがあります。
- ・酵素反応を阻害する物質の混入により、酵素が働かないことがあります。
- ・実験開始までの試薬の保存条件が良好ではない場合、酵素の失活、基質の酸化により、発光反応が起こらない可能性があります。
- ・実験室内が十分に暗くない場合、または観察者の目が慣れていない場合、発光を確認しにくいことがあります。
- ・「温度による酵素活性の変化」の実験において、温度・時間を間違えてしまった場合、タンパク質の変質が促進され、発光が極端に低下する、または酵素が失活することがあります。
- ・各試薬のスポートを混同した場合、試薬が混ざり、発光色の変化、発光量の変化を確認できないことがあります。

VI. pH 変化による発光色の変化について

タンパク質は、20 種のアミノ酸によって作られています。タンパク質を構成するアミノ酸の中には、周囲の pH の変化によって、その側鎖の解離状態 ($- \rightarrow \pm \rightarrow +$) が変化し、タンパク質の働きが変化するものがあります。ホタルの発光反応においても、タンパク質のポケットの中に存在するオキシルシフェリン(ルシフェリンの酸化物質)は、光を発する際、周囲の pH の違いによって解離状態が変化します。pH が酸性になり解離状態が $- \rightarrow \pm$ へと変化した時、発光色が緑色 \rightarrow 赤色に変わると考えられています。このように、生体分子は水溶液の pH 変化による影響を大きく受けます。ホタルの発光色の変化は、pH の違いによるタンパク質・発光基質の変化を反映したものです。



VII. 参考文献

1. Alam, J. and Cook, J. L. (1990) "Reporter Genes: Application to the Study of Mammalian Gene Transcription", *Anal. Biochem.* 188, 245-254.
2. S. J. Gould and S. Subramani (1998) "Firefly Luciferase as a Tool in Molecular and Cell Biology", *Anal. Biochem.* 175, 5-13.
3. de Wet, J. R., et al. (1985) "Cloning of Firefly Luciferase cDNA and the Expression of Active Luciferase in *Escherichia coli*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7870-7873.

4. de Wet, J.R., et al. (1987) "Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells", *Mol. Cell. Biology*, 7, 725-737.
5. Ow, D., et al. (1986) "Transient and Stable Expression of the Firefly Luciferase Gene in Plant Cells and Transgenic Plants", *Science* 234, 856-859.
6. Wood, K.V., et al. (1984) "Synthesis of Active Firefly Luciferase by in vitro Translation of RNA Obtained from Adult Lanterns", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 124, 592-596.
7. Williams, T.M., et al. (1989) "Advantages of Firefly Luciferase as a Reporter Gene" *Anal. Biochem.* 176, 28-32.
8. Wood, K.V. and Deluca, M. (1987) "Photographic Detection of Luminescence in *Escherichia coli* Containing the Gene for Firefly Luciferase", *Anal. Biochem.* 161, 501-507.
9. Wood, K.V. et al. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 124, 592
10. deWet, J.R. et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7870.
11. Wood, K.V. (1991) In: *Bioluminescence and Chemiluminescence: Current Status*, eds. P. Stanley and L. Kricka, John Wiley and Sons, Chichester, 11.
12. Matthews, J.C. et al. (1977) *Biochemistry* 16, 85.
13. Lorenz, W.W. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4438.
14. Bothwell, A.L.M. et al. (1981) *Cell* 24, 625.
15. Senapathy, P. et al. (1990) *Meth. Enzymol.* 183, 252.
16. Caswell, S. et al. (1989) *Mol. Cell. Biol.* 9, 4248.
17. Gluzman, Y. (1981) *Cell* 23, 175.
18. Schmidt, E.V. et al. (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10, 4406.
19. Wagner, E.F. et al. (1985) *EMBOJ.* 4, 663.
20. Stewart, C.L. et al. (1987) *EMBOJ.* 6, 383.
21. Fart, A. and Roman, A. (1991) *Nucl. Acids Res.* 20, 920.

VIII. 使用上の注意

- ご使用前に必ず安全データシート(SDS)をお読み下さい。
- 本製品を研究用途以外には使用しないで下さい。
- 日本国内のみで使用して下さい。
- 使用期限と保存条件を必ず守って下さい。
- 本製品を火気に近づけないで下さい。
- 本製品の廃棄は、お客様の施設の廃棄ルールに従って処分して下さい。
- 本製品に使用する他の試薬・器具・機械は、使用前に必ず各々の使用説明書をよく読み、その指示に従って調整・準備を行って下さい。
- 本製品に使用する他の試薬・器具は必ず滅菌して下さい。
- 材質によっては、試薬の付着により腐食・変色する場合があります。試薬が付着した器具・機械は蒸留水でよく洗浄して下さい。
- 試薬類を誤って飲み込んだ場合は、応急処置として水を飲ませ、直ちに医師の診断を受けて下さい。
- 手袋、保護メガネ等により適切な身体保護を施し、試薬類の身体への接触を避けて下さい。試薬類が目に入った場合や皮膚に付着した場合は、応急処置として水で洗い流し、直ちに医師の診断を受けて下さい。
- その他、不明な点がございましたら、下記問い合わせ先までご連絡ください。

問い合わせ先

東洋ビーネット株式会社
 〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目2番1号
 E-mail: b-net.bio@artiencegroup.com
 HP: <https://artiencegroup.com>