

新開発「シート培地『サニ太くん』高校生物実験教材用」を使った 大腸菌の遺伝子発現調節の実験 ～遺伝子分野でもシンプルな実習を～ 兵庫県立須磨東高等学校 薄井 芳奈

1. はじめに

このたび、化学企業「JNC 株式会社」と連携して、高等学校での生物実験教材の開発を行った。「シート培地『サニ太くん』高校生物実験教材用」である。「遺伝子の発現調節」の単元で使える非常に簡便な教材で、この新開発教材を使った遺伝子分野のシンプルかつ準備も簡単な実験、「ラクトースオペロンの発現調節」を報告したい。



図1 シート培地「サニ太くん」

高等学校の生物における実験実習は、体細胞分裂の観察や、脱水素反応によるメチレンブルーの脱色の観察などに代表されるように、教科書で学習したことを、実際に目の前で起こし、観察し、データを取って確認し、理解を深める、というものであったと思う。

ところが、遺伝子分野をよりくわしく学ぶようになって、遺伝子組換え実験など、ひとつの実験の中にたくさんの要素が入っている実験実習が取り上げられるようになった。もちろん、生徒の興味関心や学習への意欲を喚起する機会となり、そのような実験に取り組む意義も大きいですが、一方でこの分野においても、シンプルに、ポイントをしばった学習体験ができる実験実習が必要であると強く感じてきた。

また、先生方の「教師の準備に負担感がある」、「設備品や試薬・教育用キットなどが高価で、すぐには実施しにくい」、「時間割変更が難しくまとまった時間が取れない」といった声も耳にしてきた。安価で50分授業に楽に収まる、取り組みやすい実験がプランできないものか、という思いが募っていた。

そのような中、JNC 株式会社の製品「サニ太くん」を知り、サンプルを使用してみて、その簡便さ、わかりやすさが、高校の実験用教材として非常に優れた可能性をもつと感じた。製造元に教材用シートの開発を依頼し、協力をいただけることとなった。

2. 教材の概要

JNC 株式会社の製品、シート培地「サニ太くん」は食品・環境中の微生物検査に用いられるシート培地で、シートの透明カバーを開け、試料を滴下してカバーを閉じるだけの簡単な手順で使うことができ、35°C 24 時間の培養で発色した鮮明なコロニーを確認できる。一般生菌用、大腸菌群用、サルモネラ菌用など、いろいろな種類が発売されている。

「サニ太くん 高校生物実験教材用」のシートは、TTC(脱水素酵素のはたらきにより還元されると赤色になる)が含まれている一般生菌用のシートをベースに、ラクトースオペロンの ON/OFF を観察できるようにつくっていただいたものである。

シートには、X-gal を含む「lac-シート」と X-gal とラクトースオペロンの発現を強く誘導する IPTG を含む「lac+シート」の2種類がある。どちらのシートにも TTC が含まれているため、大腸菌を培養し、ラクトースオペロンの発現がないときには、TTC の発色で赤色のコロニーが確認できるようになっている。試料にラクトースや IPTG を混ぜて「lac-シート」に滴下すれば、ラクトースオペロンが発現して、X-gal の発色により青色のコロニーとなる。また、「lac+シート」には X-gal と IPTG が含まれているため、ラクトースオペロンの発現が誘導されて青色のコロニーができる。

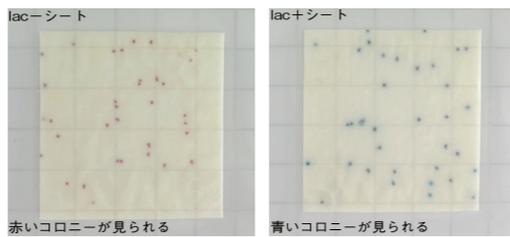


図2 シート上のコロニー

大腸菌は前もって培養済の「サニ太くん」のコロニーからつまようじで釣菌し、PBS などに懸濁することで使用できる。「サニ太くん」で培養した大腸菌は、そのままチャック袋などに入れて冷蔵庫で1か月程度の保存をすることもできる。

生徒実習は大腸菌を希釈して、2種類のシートに定量を滴下するだけの操作で、翌日以降コロニーの発色を確認すればよく、授業時間内に無理なく実施できる。35°Cで18時間後からコロニーの発色が確認でき、24時間以降は冷蔵保存が可能なので、次の授業時間に結果の観察を実施できる。30枚まで重ねて培養できるため、培養スペースも取らない。

本教材は「大腸菌のラクトースオペロン」の ON と OFF だけに焦点を当てたシンプルな実習を簡便に行うことができる。また、青白選択に対応する培地であるため、その他の要素を盛り込んだ発展的な実験に使用することも考えられる。



図3 菌の滴下

教師が事前に培地を作製したり、菌の復元を行ったりする手間がないこと、事後の殺菌処理も鍋での煮沸で可能で、オートクレーブがなくても実施できること、コンパクトな定温器があればよいことなど、一般的な高等学校の設備で無理なく実施できる教材となっており、実施へのハードルは非常に低い。さらに、X-gal と IPTG による発色は「サニ太くん」大腸菌群用などに使われているので、学習したラクトースオペロンの発現が実験、研究だけでなく、実際に衛生現場で細菌検出のために利用されていることに触れることができるのも、面白いところである。

3. 基本の実験の内容

① IPTG によるラクトースオペロンの発現誘導を確認する実験

大腸菌懸濁液の10倍希釈列をつくり、lac-・lac+それぞれのシートに、あらかじめ決めた2段階の濃度から1mLずつ滴下し、24時間後にコロニーのようすを観察記録する。

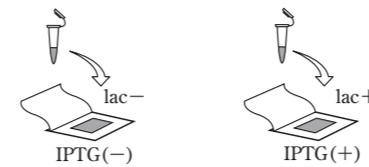


図4 IPTGによる発現誘導の確認実験

② IPTG およびラクトースによるラクトースオペロンの発現誘導を確認、比較する実験

大腸菌懸濁液の10倍希釈列をつくり、希釈液そのままのもの、希釈液にラクトース水溶液を加えたものを用意する。それぞれを lac- のシートに1mLずつ滴下する。また、希釈液そのままを lac+ のシートに滴下する。24時間後にコロニーのようすを観察記録する。



図5 IPTGによる発現誘導の比較実験

IPTG の入手が可能なら、シートはすべて lac- を使い、ラクトース水溶液と同様に IPTG 水溶液も懸濁液に加える方法で比較する実験もできる。

基本の実験②の場合、準備物は以下の通りである。

「サニ太くん」

- スタートシート(大腸菌 K12 株培養)1枚 (図6上)
- lac-シート 4枚/班 (図6左下)
- lac+シート 2枚/班 (図6右下)

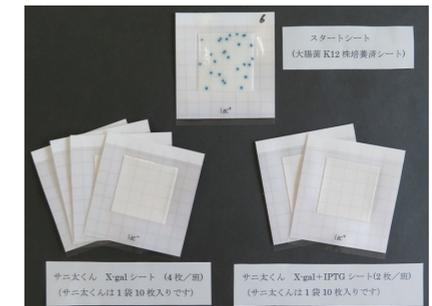


図6 「サニ太くん」は1袋10枚入り

実施校で準備するもの

- ・釣菌用つまようじ(滅菌できればベター)
- ・5%ラクトース水溶液
- ・消毒用70%エタノール(スプレー)
- ・PBS(ペットボトルのミネラル水で十分)
- ・小分け用容器(10mL程度 班数+釣菌用1本)
- ・マイクロチューブ(スクリュー瓶などでも可)
- ・1mLポリスポイト(目盛り付き) 2本/班
(マイクロピペットがあればベター)
- ・35°C保温できるインキュベーター
- その他、チューブ立て 油性ペン 石けんなど

4. 授業実践

2014年2月に2年理系「生物」選択者を対象に、「原核生物の遺伝子発現調節」の学習に続く形で、基本の実験②の実験授業を行った。

(1) 事前学習 (15分間)

教材の紹介、実験内容についての説明とマイクロピペットの使い方と練習を行った。

(2) 実験当日 (50分間)

全体の注意、ラベル書きなどの準備、希釈用PBSなどの分注、代表者による釣菌、菌の希釈、サニ太くんへの滴下、後片付けまでを行った。

【実験手順】

- ① 薬用石けんで手洗い、机上は消毒用アルコールをスプレーして拭き、手袋マスクを着用した。
- ② 希釈用のチューブと「サニ太くん」へのラベル書きを行った。どのシートにどのチューブの溶液を滴下するかを確認しながらラベルを書くことで、実験の見通しを立てる。

- ③ 希釈用PBSの分注とラクトース水溶液の添加を行った。

- ④ 代表生徒1名がつまようじで「サニ太くん」のコロニーから釣菌した。その菌を使うという理解を共有するため、ビジュアルプレゼンターを使ってモニターで全員が見守る中で行った。



図7 シートからの釣菌

- ⑤ 菌の懸濁液を各班に分け、希釈した。
- ⑥ シートと菌懸濁液の組み合わせを確認しながら、サニ太くんの透明カバーを開いて滴下し、隙間ができないように透明カバーを閉じた。慣れない作業も班員が協力することでスムーズに進む。



図8 協力しながらシートに滴下する

- ⑦ 班ごとにプラスチック容器にシートを重ねて入れ、35℃で翌日の授業まで培養した。



図9 重ねて培養

- ⑧ 実験台をアルコールで拭き、手洗いをして完了。実験中、菌の付いたチップやチューブは

各班1つのビーカーに入れるようにし、終了後に回収し、教師が加熱処理をしてから廃棄する。

(3) 結果の確認と考察 (30分間)

① ディスカッションー1 (結果の予想)

事前に自分で結果を予想し、班の中でその根拠を話し合った。また、希釈とコロニー数の関係について確認した。

② 結果の観察とスケッチ

シートを観察し、コロニーの色を確認、スケッチした。

③ ディスカッションー2 (結果の考察)

実施2クラスとも、どの班も違いがはっきりと分かる結果が得られた。実験のからくりがシンプルで捉えやすいため、グループディスカッションでも各シートのコロニーの色の違いが、自分たちの変えた条件やラクトースオペロンの発現とどのようにつながっているかを、授業で学習した内容に沿って説明しようと、活発に発言が出ていて、活気のある授業になった。さらに、「シートの内面を指で触った」、「希釈時のピペット操作が確実ではなかった」、などが、そのままコロニーの色や数としてあらわれていて、実験操作を振り返ることもできた。

教科書で学んだことを、ポイントをしばって実験として取り上げ、目で見て確認させることができ、この教材が学習に大きな効果を発揮することを実感した。また、準備や後始末、生徒への安全面、技術面での指導も無理なく行うことができた。

5. 「サニ太くん」を使った「大腸菌の形質転換」

「サニ太くん 高校生物実験教材用」は、大腸菌の形質転換の実験でも培地として使用できる。菌の希釈液にアンピシリンを加えておき、薬剤耐性による選別を行う。シートの発色にX-galとIPTGを使っ

ているので、lacZ発現系のプラスミドを使えば、コロニーの色の違いで形質転換を確認することができる。

本校では、2014年6月に生徒実験を実施した。ここでも、シンプルな実験であること、通常の時間割の中で50分の授業時間内に実施できることを大切にしたい。そのため、実験は「大腸菌にプラスミドを導入し、取り込んだ菌ではプラスミド上の遺伝子が発現して形質転換が起こっていることを、薬剤耐性やコロニーの色で確認する」ことだけにしぼった。

培地に「サニ太くん」を用いることで、教師が培地をつくる手間が必要なくなり、生徒も簡易な操作で菌を培地に確実にまくことができる。既製の高效率コンピテントセルを使い、コンピテントセル作製の手順を省くとともに、形質転換の手順も簡素化し、時間的なゆとりをつくることと、成功率を上げる効果を狙った。

コンピテントセルは、(有)サイトローブのRH617 Value 108 HIT-DH5aを購入した。

このコンピテントセルはヒートショックが不要で、プラスミドDNAと混合後、数分間水中におくだけで、高效率に形質転換を行うことができる。また、青白ス

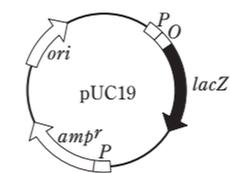


図10 pUC19プラスミド

クリーニングに用いられるpUC19プラスミドが、コントロールプラスミドとして添付されてくるので、別途プラスミドを購入しなくてもよい。細胞はドライアイスを使って、数日間、冷凍庫で安定に保管が可能であった。

一方、細胞の選別に用いる抗生物質のアンピシリンは、自分たちの手で添加する手順をおき、対照実験との違いを明確に意識できるようにした。アンピシリン購入の初期投資は必要になるが、ストック液は凍結保存もでき、直前の準備は分注だけになる。

実験は、プラスミドの導入の操作を行った試料、行っていない試料を、それぞれアンピシリンを添加、無添加の希釈液に懸濁した上で、「サニ太くん」lac+シートで培養した。「サニ太くん」は菌濃度が高すぎると発色に支障が出るため、アンピシリン無添加の試料は10⁴倍に希釈してシートに滴下した。

プラスミドを取り込んだ菌は、アンピシリン耐性を獲得し、また、β-ガラクトシダーゼを合成して

青色のコロニーをつくる。アンピシリン無添加のシートには形質転換が起こらなかった菌も生育するため、多数の赤いコロニーが出現する。「サニ太くん」ではシートの区画線を利用して菌数を求めることができ、形質転換の効率を計算させることもできる。

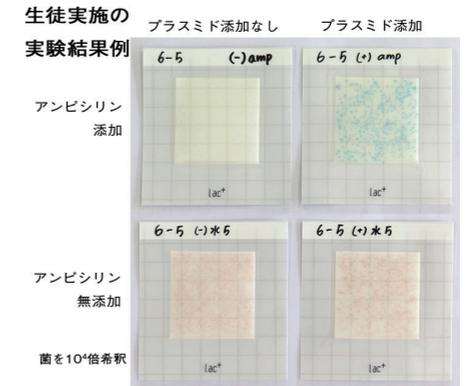


図11 大腸菌の形質転換 生徒の実験結果例

6. おわりに

「サニ太くん 高校生物実験教材用」は、高等学校の生物実験のために、JNC株式会社において特別につくっていただいているもので、現在、モニター品段階のため、一般には市販されていない。実験の「準備マニュアル」や「入手方法」など詳細は、兵庫県立須磨東高等学校のホームページ「須磨東 理科実験教材の広場」に掲載している。

<http://www.hyogo-c.ed.jp/~sumahigashi-hs/>

「サニ太くん」の取扱いについては、JNC株式会社サニ太くんホームページにくわしい資料が出ている。

<http://www.jnc-corp.co.jp/sanita/>

JNC株式会社の協力を得ることができ、非常に使いやすい教材が誕生した、と実際に生徒実習を行う中で強く実感している。細菌を取り扱う実習は、その経験が少ない教員にとっては準備や管理についての不安もあり、どうしてもハードルが高くなる。「サニ太くん 高校生物実験教材用」で、遺伝子の分野でも、シンプルで、ポイントをしばった生徒実習に簡易に取り組むことが可能になった。ぜひとも、多くの先生方に、この教材の良さを知っていただき、使っていただきたいと願っている。