

シート培地「サニ太くん」を用いた生徒実験 大腸菌ラクトースオペロンの発現調節

兵庫県立須磨東高等学校 薄井 芳奈

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いました。「遺伝子の発現調節」の単元で使える非常に簡便な教材です。

教材の試作品ができて来て、この新規教材を使った生徒実習の授業、「大腸菌ラクトースオペロンの発現調節」を公開授業として行いました。



・2月13日（木）4限（11：40～）・6限（14：15～）50分間
菌の希釈と培養まで

・2月14日（金）2限（9：40～）・4限（11：40～）20分間
コロニーの発色の確認と考察・ディスカッション

いずれも本校生物実験室にて 2年理系生物選択者（2年6組18名・7組17名）を対象に実施

【教材の概要】

JNC 株式会社の製品、シート培地「サニ太くん」に改変を行い、ラクトースオペロンのオン／オフをコロニーの色で見分けることができるシートにしました。X-gal を含んだ「サニ太くん」と X-gal とラクトースオペロンの発現を強く誘導する IPTG を含んだ「サニ太くん」の2種類のシートがあります。

X-gal を含んだ培地で大腸菌を培養し、ラクトースオペロンの発現がないときには、赤色のコロニーが確認できるようになっています。試料にラクトースや IPTG を混ぜて滴下すれば、ラクトースオペロンが発現するため、コロニーは青色になります。また、X-gal + IPTG のシートで大腸菌を培養すれば、ラクトースオペロンが発現するため、青色のコロニーとなります。

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、懸濁液を生理食塩水やPBSで希釈することで使用できます。

「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かぶせるだけの簡単な手順で使うことができ、35℃ 24時間の培養で発色した鮮明なコロニーを確認できます。

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（24時間以降は冷蔵保存が可能なので次の授業時間に）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ができます。

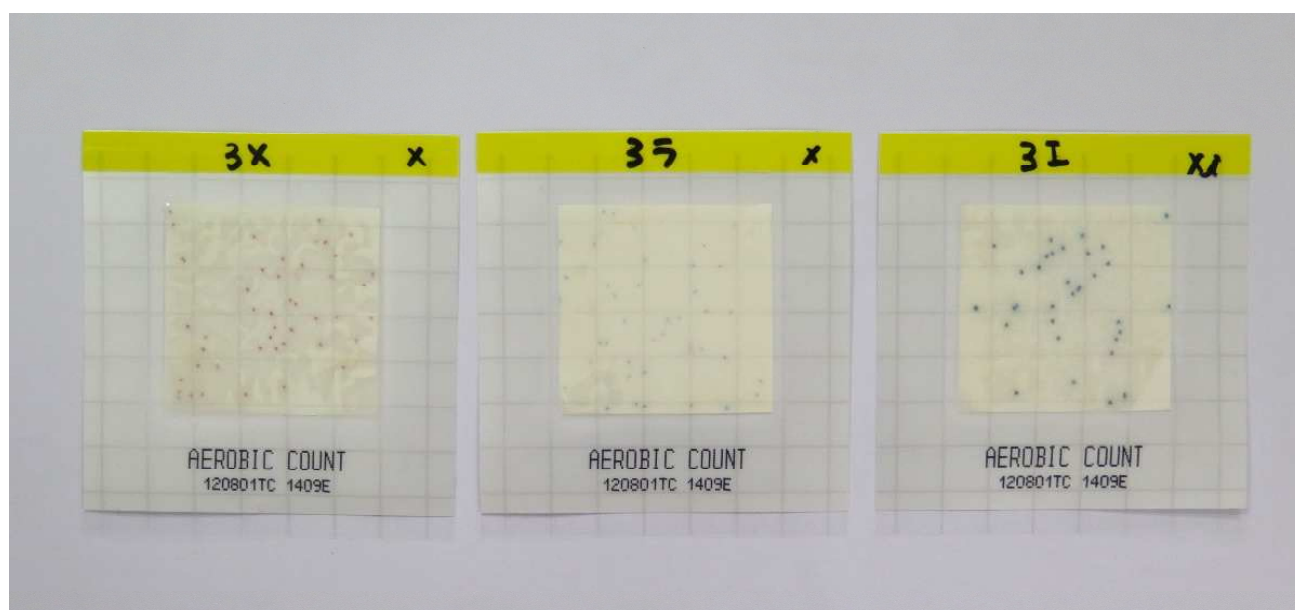
遺伝子発現の単元では、大腸菌や酵母を使った形質転換など、内容的にも、操作の手数としても、多くのことが盛り込まれている実習が取り上げられていることが多く、教科書の内容に直結するシンプルな実験実習を望む声を先生方からもよく聞きます。

本教材は、「大腸菌のラクトースオペロン」のオンとオフだけに焦点を当てたシンプルな実習を行うことができます。また、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可能です。

何より、先生方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く、また、事後の殺菌処理も簡単であること（オートクレーブがなくても可能）、コンパクトな定温器があれば実施できることなど、一般的な高等学校の設備で難なく実施できる教材になっています。

X-gal と IPTG による発色は「サニ太くん」の大腸菌群用などに使われているので、教科書に出てくるラクトースオペロンが実験、研究だけでなく、実際の衛生現場での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、面白いところです。

なお、この教材に関するお問い合わせは、当面は 須磨東高等学校 薄井まで お願いいたします。



左から

3 X : X-gal を含み IPTG を含まないサニ太くん で PBS で希釈した大腸菌 (K12 株) を培養
(ラクトースオペロンは OFF で培地に含まれている TTC により赤色に発色したコロニーが観察できる)

3 ラ : X-gal を含み IPTG を含まないサニ太くん でラクトース (0.5 %) を混合した PBS で希釈した大腸菌を培養
(ラクトースオペロンは弱く発現し、うすい青色のコロニーが観察できる)

3 I : X-gal と IPTG を含んだサニ太くん で PBS で希釈した大腸菌を培養
(ラクトースオペロンは強く発現し、濃い青色のコロニーが観察できる)

いずれもサニ太くんのコロニーからつまようじで釣菌して 1000 倍希釈

35℃ 24 時間 培養したもの 2014.2.11 須磨東高校にて実施・撮影

【教材を用いた授業実践】

1. 事前学習

「原核生物の遺伝子発現調節」の学習に続いて、15分間程度で行いました。

- ・ X-gal 発色のしくみ、IPTG のはたらき
- ・ 「サニ太くん」大腸菌群用・一般生菌用の紹介 「サニ太くん」の使用法の説明
実験で使用する特別バージョン「サニ太くん」の説明と実験の概要について
- ・ マイクロピペットの使い方とその練習 （この実験にマイクロピペットは必須ではありません。
本校では後の実験計画との関連もあり、今回のタイミングで使ってもらいました。）

2. 実験当日

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、50分の授業時間をすっきりと使うことができました。

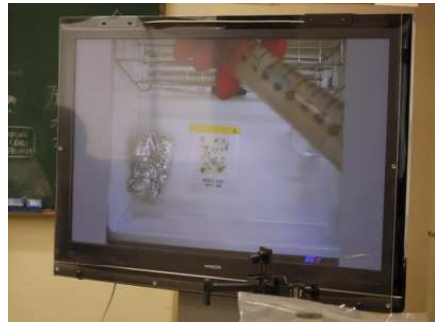
- ①まずは手洗いから。机は消毒用アルコールをスプレーして拭き、手袋マスクを着用しました。
- ②希釈用のチューブとサニ太くんへのラベル書き どのシートにどのチューブの溶液を滴下するかを確認しながらラベルを書くことで、実験の見通しを立てます。



- ③希釈用 PBS の分注とラクトース入り PBS を作ります。



- ④つまようじでサニ太くんのコロニーから釣菌。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代表生徒にやってもらいました。その菌を使うという理解を共有するためです。



⑤菌の懸濁液を各班に分け、それを希釈していきます。今回は 1000 倍希釈と 10000 倍希釈にしたものを、条件を変えて 6 枚のシートで培養します。条件は次の表の組み合わせで行いました。

X-gal (IPTGを含まない) 培地	X-gal (IPTGを含まない) 培地	X-gal + IPTG培地
大腸菌 (K12 株) 懸濁液	ラクトースを添加した 大腸菌 (K12 株) 懸濁液	大腸菌 (K12 株) 懸濁液



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ます。隙間ができないように透明カバーを閉じます。



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ます。サニ太くんは 30 枚まで重ねることができるので、小さいスペースで保温が可能です。



⑧菌の付いたチップやチューブは各班 1 つのビーカーに集めています。教師が回収し、加熱処理をしてから廃棄します。実験台の上をアルコールで拭き、手洗いをして完了です。

翌日の授業まで培養すると
6 組が約 19 時間 7 組は 24 時間
の培養時間となります。
(24 時間以上あくときは冷蔵庫に移しておけばよい)



3. 結果の確認と考察（翌日以降の次の授業時 20～30分間）

①ディスカッションー1 結果の予想

いきなり結果を見るのではなく、まず、班の中で自分で考えてきた結果の予想を出し合い、その根拠を話し合いました。また、1000倍／10000倍のシートでは何が違うか、前日に行った希釈の意味とコロニー数の関係について確認しました。

②結果の観察とスケッチ

各班のシートを観察し、コロニーの色を確認、スケッチします。

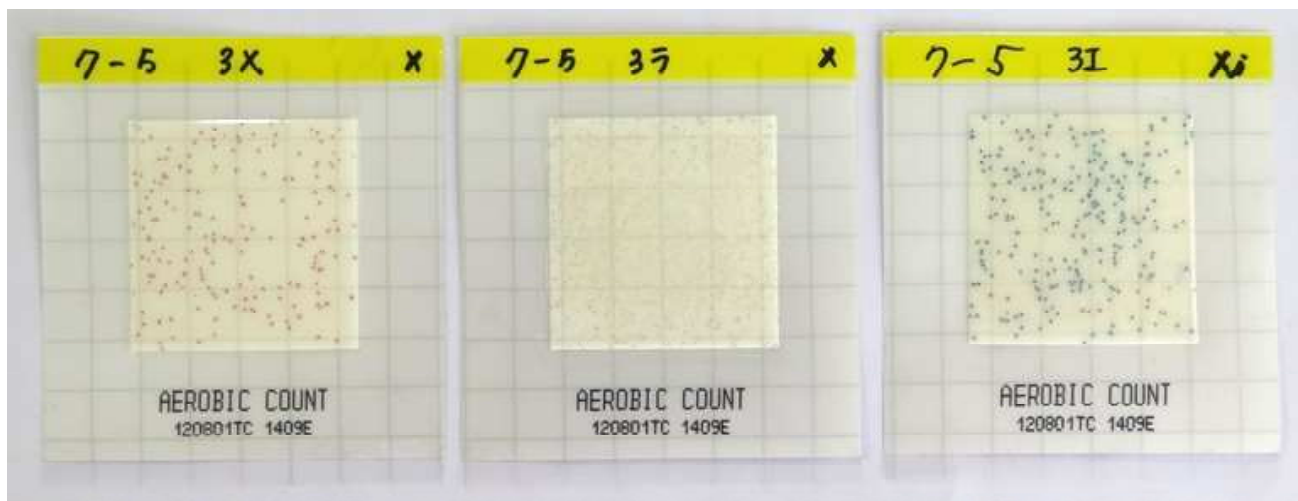


③ディスカッションー2 結果の考察

2クラスとも、どの班もきれいに結果が出ており、違いがはっきりと分かりました。実験のからくりがシンプルで捉えやすいこともあって、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が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りました。

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、などのことが、そのままシートのコロニーの色やコロニー数としてあらわれ、それは心当たりがある、と、実験操作を振り返ることもできました。

生徒実施の実験結果例



X-gal (IPTGなし)

X-gal (IPTGなし)ラクトース添加

X-gal + IPTG培地

今回、実際に生徒実習に使ってみて、この教材が学習に大きな効果を発揮することを実感しました。また、準備や後始末も、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ました。ぜひとも、多くの高等学校の先生方に興味を持っていただき、使っていただければと願っています。