

## シート培地「サニ太くん」を用いた生徒実験 50分授業で楽にできる 大腸菌の形質転換

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。

開発した教材「シート培地 サニ太くん 高校生物教材用」を用いて、市販の教育用キットを使用せず、簡単な準備で、生徒実習の授業、「大腸菌の形質転換」を行いました。



- ・6月10日(火) 2限(3-7)・5限(3-6) 50分間

プラスミドの導入と培養まで

- ・6月11日(水) 1限(3-7) 20分間

- 6月12日(木) 6限(3-6) 20分間

コロニーの発色と数の確認 考察・ディスカッション

いずれも本校生物実験室にて 3年理系生物選択者(3年6組16名・7組19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簡単に見分けることができるシートにしました。

「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。

教材用に開発したシートには、X-gal を含んだ「サニ太くん lac -」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 lac +」の2種類があります。

「サニ太くん lac +」「サニ太くん lac -」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、培地に含まれている 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ます。ラクトースオペロンが発現すると、X-gal の発色により、青色のコロニーとなります。また、「サニ太くん lac +」には IPTG が含まれているため、大腸菌がラクトースオペロンを持っていれば、その発現が誘導されて青色のコロニーができます。

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。

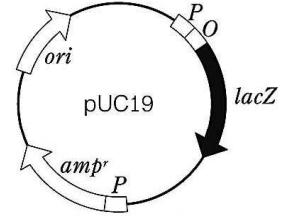
今回は、遺伝子 *lacZ* を持たない大腸菌に、*lacZ* を含むプラスミドを導入し、形質転換を確認する実験に、X-gal と IPTG を含んだ「サニ太くん lac +」を使用しました。

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。

## 【使用した大腸菌】

(有) サイトローブのコンピテントセル RH617 Value 108 HIT-DH5a (100  $\mu$  l  $\times$  1箱 10本入り) を使用しました。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 (10 分まで) 氷中でインキュベートするだけで、高効率に形質転換を行うことができます。

この商品には、青白ス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、それを使用すれば、別途プラスミドを購入する必要もありません。1箱 10本の小口で購入が可能で、必要数を使い切ることができます。また、 $-80^{\circ}\text{C}$  のフリーザーがなくても、ドライアイスを使って授業までの数日間、冷凍庫で安定に保管が可能です。



\*\*\*\*\*

実験内容は「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にある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」ことだけに絞りました。

既製の高効率コンピテントセルを使うことにより、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、時間的なゆとりと成功率を上げる効果、また、コストダウンを狙いました。一方、細胞の選別に用いる抗生物質のアmpiシリンは、自分たちの手で添加する手順を置き、対照実験との違いを明確に意識できるようにしました。アmpiシリン購入の初期投資は必要ですが、ストック液は凍結保存もでき、作っておけば直前の準備は分注だけです。

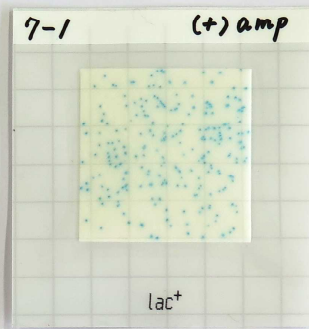
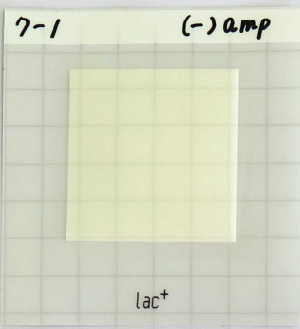
培地に「サニ太くん」を用いることで、教師が培地を作る手間が必要なくなり、生徒も簡易な操作で菌を培地に確実にまくことができます。さらに、シートの区画線を利用してコロニー数を数え、菌数を求めることができ、形質転換の効率も計算できました。

生徒実施の  
実験結果例

プラスミド添加なし

プラスミド添加

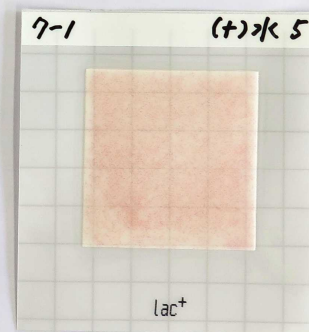
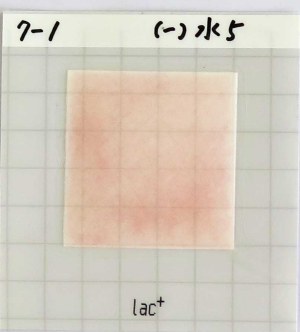
アmpiシリン  
添加



プラスミドを取り込んだ菌は、アmpiシリン耐性を獲得し、また、 $\beta$ -ガラクトシダーゼを合成して青色のコロニーを作る。

アmpiシリン  
添加なし

菌を $10^4$ 倍希釈



アmpiシリン無添加の培地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。形質転換が起こるのはごく一部の菌であることがわかる。

## 【教材を用いた授業実践】

### 0. 事前準備

前日 各班のマイクロチューブに市販のミネラルウォーターを 1mL ずつ分注 37℃に保温

当日 クラッシュ氷の準備・プラスミド DNA を希釈、分注・アンピシリンのストック液を分注

### 1. 事前学習

大腸菌へのプラスミドの導入と薬剤耐性による選別、プラスミドへの遺伝子の挿入と青白スクリーニングについて、教室で学習したことを復習をしながら、安全管理に関する学習、実験内容の説明を行い、結果の予想についてディスカッションするところまでを1コマ使って行いました。

- ・カルタヘナ法と必要な安全についての意識・ルール

(文部科学省 ライフサイエンスの広場 リーフレットを使用)

- ・プラスミドをベクターとして使った大腸菌の形質転換とコンピテントセルについて
- ・薬剤耐性による細胞選別について
- ・プラスミド上の *lacZ* 遺伝子とマルチクロニングサイト、青白スクリーニングについて
- ・X-gal 発色のしくみ、IPTG のはたらき、「サニ太くん」でのコロニー発色と使用方法
- ・今回の実験で行う部分の確認 実験結果の予想についてディスカッション

### 2. 実験当日

授業の 50 分間で、手洗いから始め、全体の注意、ラベル書きなどの準備、実験、後片づけ、事後の手洗いや消毒まで、ゆとりを持って行うことができました。

- ①まずは手洗いから。机上是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。遺伝子を組換える実験ではないとはいえ、ルールに従って安全に行う意識を全員が持つために、教室には「遺伝子導入実験実施中」の掲示、菌を扱うときには扉や窓を閉めて行いました。



- 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。マイクロピペットのダイヤル合わせやパスツールピペットなどの使用器具を確認、準備しておきます。



③アンピシリン溶液を希釈用チューブに添加します。

培地にアンピシリンが添加された状態で生徒に配布するのではなく、自分たちでアンピシリン溶液を加える操作が入るため、条件の違いをしっかりと意識することができます。

④ここからは班員全員が手順を理解してスムーズに進める必要があります。手順を確認した上で、ドライアイスの中で凍っているコンピテントセルのチューブを受け取り、半解凍状態にします。



⑤プラスミド DNA を加えない試料を取り分けた後、プラスミドを添加し、1秒だけ攪拌後に氷冷、すぐに、希釈溶液に分注し、サニ太くんに滴下します。プラスミド溶液は取る分量が小さいので、マイクロピペットのチップの先を見ながら確実に操作します。チップは廃棄用ビーカーに入れ、適切に交換しながら行います。



⑥試料を滴下したサニ太くんは班ごとにプラスチック容器に重ね入れ、35℃のインキュベーターで18～24時間培養します。



⑦チップとマイクロチューブは滅菌処理のためビーカーに入れて回収、机を消毒し、手洗いをして終了です。

### 3. 結果の確認と考察 (次の授業時 20 ~ 30 分間。サニ太くんは培養後、冷蔵保管しておく。)

#### ①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、スケッチします。

すべての班で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。

プラスミドを与え、アンピシリン

を添加していないシートは、無で

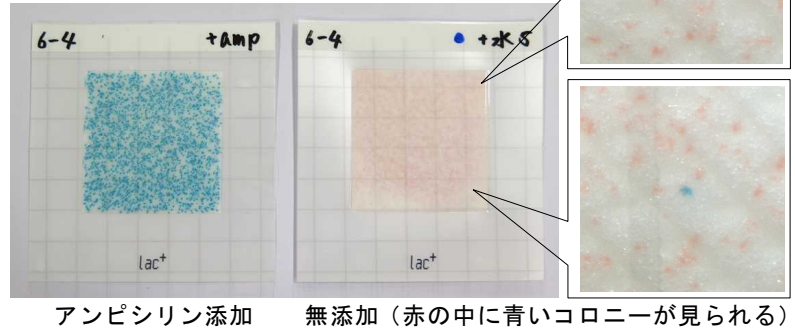
数に出ている赤いコロニーの中の

青いコロニーが宝探しのようになり、

2クラス全9班中2つの班

で青いコロニーが見つかりました。

#### ▼ 形質転換率の高かった班の例



#### ②コロニー数を数え、菌数、形質転換の効率を求める

サニ太くんにはマス目が入っており、コロニーが多いときには1マスのコロニー数を20倍することでシート全体のコロニー数を求めます。いくつかのマスについて数え、平均数を20倍して、菌数を求めました。さらに、アンピシリンを添加していない試料は $10^4$ 倍に希釈したため、求めた菌数を $10^4$ 倍して、はじめの菌数を求めます。それをもとに、自分たちの班では何%の菌に形質転換が起こったのかを求めました。

#### ③ディスカッション 結果の考察

各シートのコロニーの色や数の違いについて、自分たちが変えた条件や形質転換の有無とどのようにつながっているか、ディスカッションしながら考察しました。さらに、希釈時のピペット操作が確実にできていたか、など、シートのコロニー数を見ながら実験操作を振り返りました。

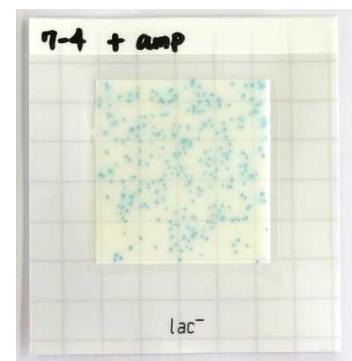
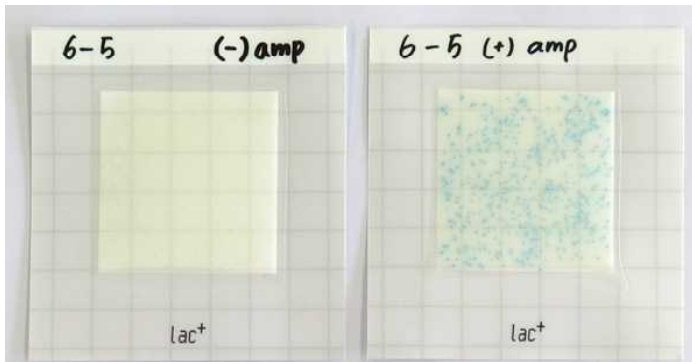
生徒実施の  
実験結果例

プラスミド添加なし

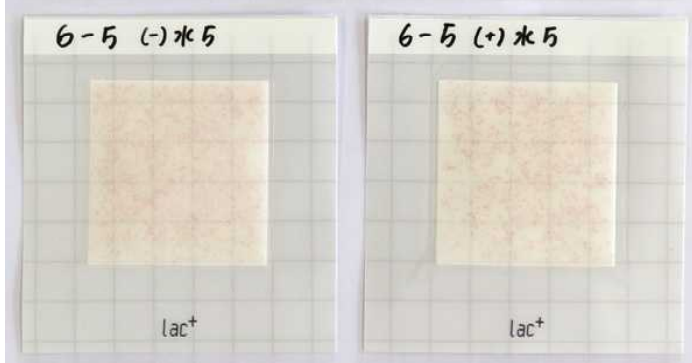
プラスミド添加

プラスミド添加

アンピシリン  
添加



アンピシリン  
添加なし



菌を $10^4$ 倍希釈

#### ▲ lac-のシートで培養

使用した大腸菌 DH5a は IPTG を添加しなくても、培地に X-gal があれば、青白スクリーニングが可能なので、lac-のシートを使っても青いコロニーが出ます。