

高校生物Ⅱにおける形質転換実験のすすめ方

筑波大学附属駒場高等学校

石 川 秀 樹
貝 沼 喜 兵

高校生物Ⅱにおける形質転換実験のすすめ方

石川 秀 樹, 貝 沼 喜 兵

1. 実践研究のねらい

形質転換の実験は、「DNAが遺伝子の本体であることを直接的に実証する実験」である。生物Ⅰ、あるいは生物Ⅱの課題実験および生物部の実験テーマとして取り上げたい実験である。しかし、設備、実験技術面、あるいは費用面で、高校では実施困難であるとの見方がある。筆者らは、ここ10年間生物、あるいは生物Ⅱの授業で、形質転換を中心とする関連の実験について指導実践を積み重ねてきた。今回は、VTRを用いて実験の簡便化、実験の技術面に焦点を絞ってその実験のすすめ方を紹介し、あわせて指導上の諸問題について検討をする。

2. 実験の原理

(1) 実験材料 枯草菌を用いる。遺伝形質は次の通りである。

枯草菌 (*Bacillus subtilis* wild : W23

: ade^+ , leu^+ , arg^+ , mutant : YS11 : ade^- , leu^- , arg^- .)

これは、表1の形質を有する

表1 枯草菌の遺伝形質

	M	Ade ⁻	Leu ⁻	Arg ⁻	All
W23	+	+	+	+	+
YS11	-	-	-	-	+

(+ : コロニーを形成する)
(- : コロニー形成せず)

ただし、(Mは最小培地、All=M+アデニン+ロイシン+アルギニン、Ade⁻=Allよりアデニンを除いたものである。)

(2) 実験の原理

W23の生菌からDNAを抽出し、コンピテントにしたYS11の生菌にW23DNAを加え保温、対照実験と比較してYS11の遺伝形質がW23DNAの取り込みによりその遺伝形質が転換することを見るものである。従って本実験は、次のような小実験から成り立っている。

① W23 (wild) の培養と集菌

② W23生菌からDNAの抽出と精製 (同時に加水分解物のペークロ)

③ YS11をコンピテント (DNAを取り込める生理的状态で cp と略記する) にし、これにW23DNAを加えて保温する。

④ 選択培地を調整し、これに③の菌を塗抹し、対照区と比較して転換菌を検出する。

3. 実験の方法

① W23とYS11の遺伝形質の比較

はじめに、実験に用いるW23とYS11の遺伝形質を確認する必要がある。

選択培地 (M, Ade⁻, Leu⁻, Arg⁻, All) を調整してこれにW23とYS11を培養する。(a) 塗りつけ法, (b) 寒天重層法)

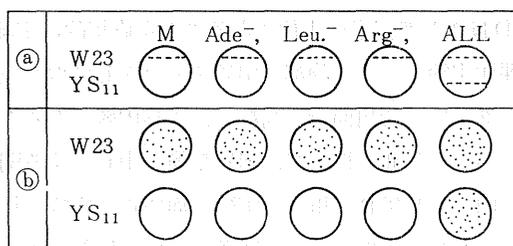


図1 W23とYS11の遺伝形質

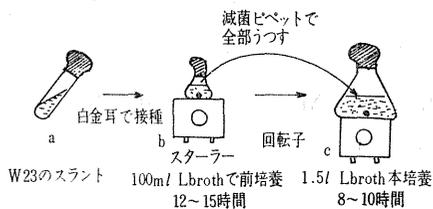
できるならば、⑥法を採用し、コロニーについて観察検討をしたい。

培地の調整については、参考文献を参照。

② W23生菌の増殖と集菌

DNAを抽出するW23の生菌を得るためである。ただし、VTRでは空気ポンプで通気する方法を紹介する。

a) 菌の培養 (37℃の恒温器で行なう)



b) 集菌

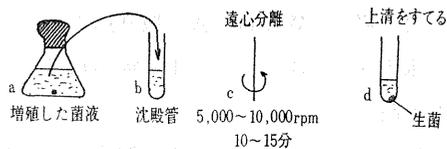


図2

③ DNAの抽出 (Murmur を簡便化)

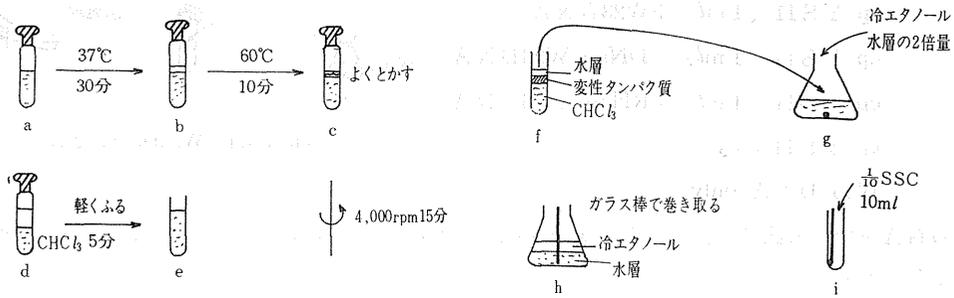


図3 CPYS11の調整法

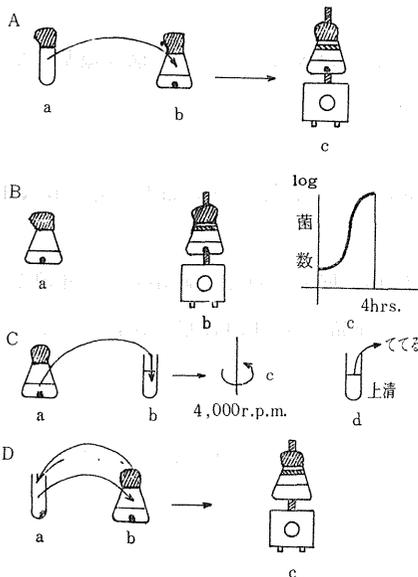
- a. 生菌0.5gにSaline EDTA 10mlを加えて菌をけん濁させ、10mgのリゾチームを加え37°C30分溶菌をする。 b. 25% SLSを2ml 加え60°Cで10分間溶菌する c. 1.5g NaClO₄を加えてとかす。 d. CHCl₃を10ml 加え振る。 e. 遠心分離すると3層に分かれる。 f. 3層分離 g. 水層を三角にとり、2倍量の冷エタノールを加えると粗DNAは折出する。 h. ガラス棒でDNAの繊維のまきとり。 i. はじめ1/10 sscを10ml 加えてよくとかす。ついで10 ssc 1ml 加える。透析(一晚)して用いる。

④ DNAの塩基分析

ペーパークロマト法については参考文献(1)を参照。

⑤ 形質転換

(イ) YS11をcpにする



- A. YS11のスラントから前培養。
B. C Iで4時間培養する。
C. C IからC IIに培地の転換をする。
D. C IIで1.5時間培養

図4 CPYS11にDNAを処理する方法

(ロ) cp YS11にW23 DNAを加えて60分保温・対照実験次のII～Vの対照区を設定する。

- I cp YS11 (1 ml) + W23 DNA
- II cp YS11 (1 ml) + DNase W23 DNA
- III cp YS11 (1 ml) + RNase W23 DNA
- IV cp YS11 only
- V W23 DNA only

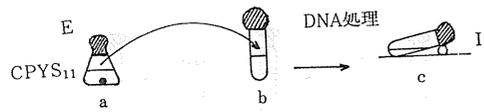


図5 cp YS11にW23DNAの処理

DNA処理の方法は、滅菌した試験管を図のようにアルミホイルでカバーしただけの簡便法で十分である。

(イ) 選択培地 (Ade⁻) で転換菌の検出

従来は、Leu⁻, Arg⁻, をも用いたが煩雑であり必要ない。

表2 形質転換の結果 (Ade⁻の培地上)

	10 ⁻¹	10 ⁻²	備 考
I	1396 1862	215 268	cp YS11 + W23 DNA
II	3 7		cp YS11 + DN ase DNA
III	2776 2200		cp YS11 + RN ase DNA
IV	0 0		cp YS11 only
V	0 0		W23 DNA only

結果はIとIII, すなわちW23DNAを加えた実験区にだけに転換菌を生じている。形質転換の原因物質はDNAである。

⑥ DNAのペーパークロマトによる塩基分析・製精DNAについて、構成塩基の種類とそのモル%を分析し、シャルガフの法則を確認する。

(イ) 粗DNAの精製

除タンパクと RNase 処理—isopropanol 沈澱—乾燥—塩酸加水分解 (6 N HCl 分解封管中)

(ロ) isopropanol : 6 N HCl の展開溶媒で 12 hrs 展開—風乾 260 mμ の紫外線を当て、Rf 値から A. T. G. C を決定する。同じ方法で純品の A. T. G. C と比較して展開すればよい。

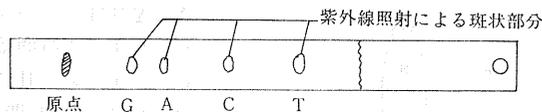


図6 DNA 塩基分析

(イ) 斑状部分を切り取り, 0.1Nの塩酸で塩基を抽出する。室温で3~4日

(ロ) 吸光度を測定し, 分子吸光係数からモル数を求め, モル比%を求める。

表3 塩基分析の結果

	測定波長	分子吸光係数	測定値	モル%	chargaffのデータ
アデニン (A)	260m μ	13.0mモル/l	0.546	38.2	28.9
チミン (T)	265m μ	7.95mモル/l	0.300	21.0	28.7
グアニン (C)	250m μ	11.0mモル/l	0.285	19.9	21.0
シトシン (G)	275m μ	10.5mモル/l	0.295	20.7	21.4

4. 指導方法とその検討

(1) 指導経過

表4 形質転換の指導の概要

	実験テーマ	備考	時間
1	遺伝形質	遺伝形質の確認と 微生物の基本操作の習得	2
2	DNA抽出	ペーパークロマトによる塩基分析も同時に実施	2
3	形質転換	結果の観察測定および後片づけを昼休みか放課後に行う	2
4	発表学習	結果について発表させる。	2

① 枯草菌の遺伝形質とその特徴 (2 hrs)

指導者は、あらかじめ菌数を調整した菌液を準備する。生徒は選択培地を調整し、菌液を希釈し、冷却固化後、寒天重層法でコロニーを形成させ、W23とYS11の遺伝形質を観察する。この実験の指導目標は、遺伝形質を観察するだけでなく、定量方法も理解させることにある。この実験に平行して微生物遺伝学の歴史を講義し、微生物遺伝学の基本的知識をも指導する。

② W23生菌から、粗DNAの抽出とDNAの塩基分析 (2 hrs)

あらかじめ教師側で準備した0.5gの生菌を各班単位(5~7人)に分配し、Murmur法で粗DNAを抽出し、それを透析精製させる。平行してDNAの塩基分析(封管で加水分解したもの(1mg DNA1班当り))を分配し、それを展開用紙にスポットさせ展開する。これまでを授業中にやらせ、風乾、紫外線での確認・切り取り後の塩酸溶出、分光光度計による吸光度測定などは、放課後にやらせた。

③ 形質転換実験 (2 hrs)

生徒実験では、生徒に選択培地の調整、cp YS11にDNAを加えて保温、選択培地へ塗株、培養などを授業中にやらせる。したがってcp YS11の調整、W23 DNAをRNase、DNaseでの処理などは、指導者側で準備しておく。結果の観察とシャーレの後片づけは、2日後の昼休みに全員集めてやらせた。

④ 実験のまとめの発表学習 (2 hrs)

(i) 指導者は、形質転換の一連の実験ならびにDNAの塩基分析の各班の data をプリントして配布し、発表学習をやらせた。

発表テーマは次のとおり

- (i) 結果とその分析
- (ii) Ade⁻のプレート上に生じたコロニーの遺伝形質は何か。それは又、どのようにすれば確認できるか。
- (iii) Y S11をW23と同じ wild にするにはどうすればよいか。
- (iv) シャルガフの仕事はどのように評価したらよいか。
- (v) この実験でDNAが遺伝子の本体であると結論できるか。できるとする根拠は何か。できないとする根拠は何か。

この発表学習の討議を参考にレポートを提出させ、それについて評価した。

(2) 評価の結果 (53年度)

表5 レポートの評価結果

	④	A	B	C	計
人数	1	23	6	0	30
%	3	77	20	0	100

(3) 指導上の問題点とその検討

①～④のような問題点が考えられる。これについて若干の見解をのべる。

① この種の実験は生徒の理解の範囲をこえているのではないか。
 そのようなことはない。十分に理解可能である。むしろ実験なしのDNAの講義は生徒を生物ぎらいにするのではないか。

② すべての実験を生徒にやらせないでよいか。

実験の性格上それは困難である。そのかわり、実験原理方法を明確にし、指導者の準備した実験についてはその理由と経過を生徒実験の前に明示すればよい。

③ 放課後、昼休み等に実験をやらせることの可否は。

形質転換は、このような方法をとらないと実施はむずかしい。しかし、この時要する時間はそれほど長時間でないので、クラブやホームルーム活動に影響がない。むしろ生徒は熱心にやるので、教師はこれにはげまされる。

④ 発表学習、レポート

全員が発表テーマについて準備するように工夫する。また、レポートは結果の考察に力点を置いて評価するようにしている。

(3) 技術上の問題点

① 一般の高校レベルの設備で可能か
 理振設備で実験可能である。

この実験に必要な機器：オートクレーブ，恒温器，遠心器（4,000 rpm）乾熱乾燥器150°C，スターラー（2～3台）冷蔵庫，マナスルライト

ガラス器具：シャーレ（9 cm）100枚，メスピペット，0.2 ml，1.0 ml，10 ml，各 30本ずつ，薬品は国産の特級試薬で十分可能である。

② 技術的問題

この実験は微生物の基本操作の経験があればむずかしくない実験である。しかし，これについて微生物についての取り扱いの経験がなくても実験のポイントの概要がつかめるように，発表時にはVTRで実験のすすめ方を紹介する。

5. お わ り に

この論文は，54年度日本生物教育会全国大会でVTRを用いて研究発表した際，資料として用いたものである。

VTRの機械を貸与されるなどいろいろ便宜をはかって下さったり，有益な助言を頂いた筑波大学助教授重松樫三先生に感謝いたします。

6. 参 考 文 献

- (1) 斉藤日向：細菌およびファージDNAの調整核酸実験法 p 32—36 共立出版
- (2) 貝沼喜兵：やさしい分子遺伝学の実験 Vol. 23, No. 2～3 遺伝裳華房