

生物学実験

(理工学群, 生命環境学群地球学類対象)

[EE11613, FB00113, FB00113, FE00113, FF00613]
2013年度秋学期AB 月曜日 4~6時限:13:45-18:00

Group A

実施日	実験テーマ	教員	TA*	教室
12月 2日	ガイダンス	中谷 敬		2D309
12月 9日	花の形態的多様性	中山 剛	井上 重毅	2B503
12月16日	生き物の模様: 分断色が持つカモフラージュ効果	大橋 一晴	伊藤 奈都美	2B403
12月25日	ショウジョウバエ発生過程における遺伝子発現の観察	丹羽 隆介	井上 重毅	2D410
1月 6日	気孔のアブシジン酸応答	三浦 謙治	伊藤 奈都美	2D410
1月21日	ラン藻の窒素代謝の環境要因による制御	新家 弘也	中山 拓弥	2D309
1月27日	タンパク質の電気泳動	鶴田 文憲	中山 拓弥	2D413

Group B

実施日	実験テーマ	教員	TA*	教室
12月 2日	ガイダンス	中谷 敬		2D309
12月 9日	ラン藻の窒素代謝の環境要因による制御	新家 弘也	中山 拓弥	2D309
12月16日	ショウジョウバエ発生過程における遺伝子発現の観察	丹羽 隆介	井上 重毅	2D410
12月25日	タンパク質の電気泳動	鶴田 文憲	中山 拓弥	2D413
1月 6日	花の形態的多様性	中山 剛	井上 重毅	2B503
1月21日	生き物の模様: 分断色が持つカモフラージュ効果	横井 智之	伊藤 奈都美	2B403
1月27日	気孔のアブシジン酸応答	三浦 謙治	伊藤 奈都美	2D410

* TA (Teaching Assistant) は生命環境科学研究科の大学院生です。

- ◆ 実験当日は各実験室に集合してください。
- ◆ 顕微鏡の取り扱いには十分注意してください。
- ◆ 筆記用具, 特にスケッチに適した鉛筆, レポート用紙を持参してください。
- ◆ 履修一般に関することは中谷までお問い合わせください。連絡先は下記のとおり。

E-mail: nakatani@biol.tsukuba.ac.jp

TEL: 029-853-6672

Website: <http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~nakatani/>

部屋番号: 生物農林学系棟 F603 (Office)

花の形態的多様性

担当（連絡先）： 宮村 新一（生物農林学系棟 B505, TEL: 6656, E-mail: miyamura.shinichi.fw@u.tsukuba.ac.jp）
中山 剛（生物農林学系棟 B508, TEL: 6659, E-mail: algae@biol.tsukuba.ac.jp）

導入

我々の身の回りにはさまざまな花が咲いており、我々の目を楽しませてくれている。花は基本的に中心から**雌しべ、雄しべ、花被片（花弁と萼片に分化していることが多い）**の順で規則正しく列んでできている。花は被子植物の生殖器官であり、雄しべで作られた花粉が雌しべの先端（柱頭）に付着、そこで発芽して花粉管を伸長、雌しべの中にある卵と受精して次世代を含む種子を形成する。

花はこのような共通の基本構造と機能を持っているにも関わらず、その要素の数、形、合着、分化の程度など**非常に大きな多様性**を示す。この多様性は、さまざまな**進化的および生態的要因**が影響して成立したと考えられる。よって、その花の構造から、その植物の系統分類学的位置を知ることができ（例えばその植物を同定するには花の形態を見るのが最も簡単）、またその花の生態的特徴（花粉媒介様式など）を推定することができる。本実験ではさまざまな花を観察し、花の基本構造とその多様性を理解すると共に、その形がもつ生物学的意味を考えてみてください。

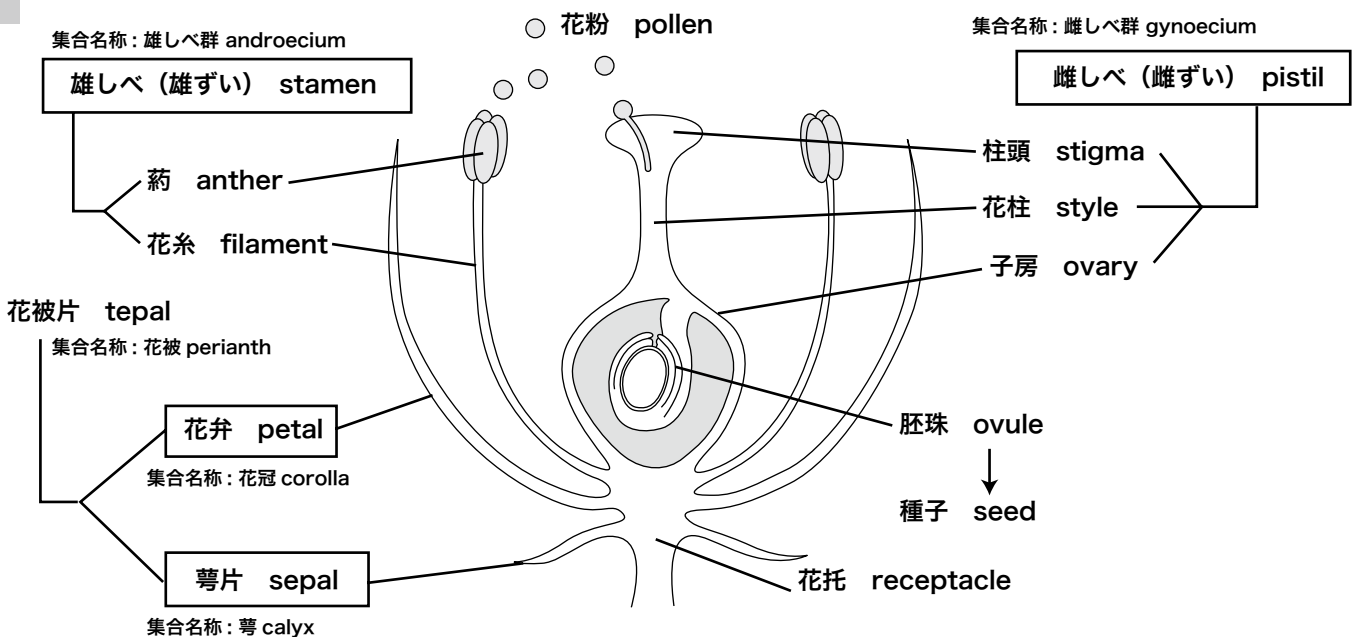
課題

3種の花を選び、その構造を観察、それぞれ**花式と花式図**を作成せよ。またその花の形から**推定される生物学的情報（系統分類学的、生態学的など）**を記せ。以上の情報を解答用紙に記入し、**3枚まとめてこの実験時間に提出せよ。**

方法

花の構造を観察、それぞれの要素（萼片、花弁、雄しべ、雌しべ→心皮）の数、相対的位置関係、合着の有無などを確認。必要に応じてピンセットなどを用いて花要素を外側から外していった花を分解しながら観察する。雌しべについては、カミソリ等で切断して子房の位置、子房の構造（胎座のタイプなど）を確認する（**カミソリの使用は十分注意すること！！**）。花の形態、花式・花式図、考察のヒントについては参考資料を当日配布する。

花の基本構造



花の形は極めて多くの情報を含んでいる。それを表す便利な手法として**花式**と**花式図**がある。

花式の例

花式とは萼 (K)、花冠 (C)、雄しべ群 (A)、雌しべ群 (G) それぞれの構成要素の数や合着を記号で表した式である。

花の相称性

放射相称花の場合には☆
左右相称花の場合には↓

式 1



心皮の数 (雌しべの数ではない!)

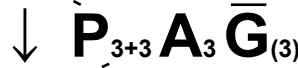
雌しべはふつう複数の心皮からなる (子房の部屋数や柱頭の分岐数で推定)
雌しべの数が複数のときは、その数が心皮の数

子房の位置

\overline{G} 子房上位
G 子房周囲、子房中位
 \underline{G} 子房下位

萼と花冠が未分化な場合 (ユリなど) は、併せて花被 (P) として示す

式 2

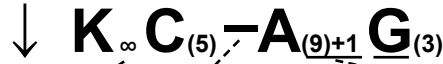


同類合着 (例えば花弁どうし、心皮どうしが合着)

離生の場合は数字をそのまま 例 3
合生の場合は数字をカッコでくる 例: (3)

花要素が2輪以上についているときは、各輪の数を+でつなく (この例では内輪に花被片3個、外輪に花被片3個)

式 3



要素の数が不特定多数の場合は ∞ で表す

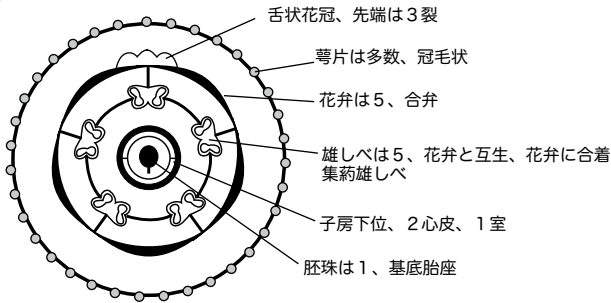
全てではなく一部のみが合着している場合、合着している数をカッコでくり、残りの数と+でつなく (ただしこのままでは2輪についていることと同じなので、区別するために全てに下線を引く)

花弁と雄しべなど異なる要素が合着している場合は (異類合着) 線でつなく

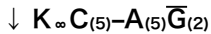
花式図の例

花式図とは、萼片・花弁・雄しべ・雌しべ (心皮) といった花の構成要素を、花を上からみた状態で全ての花要素を同一平面上に同心円上に投影した**模式図 (スケッチではない)** である。

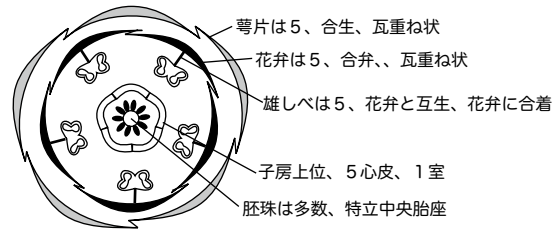
①



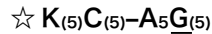
マルバダケブキ (キク科)



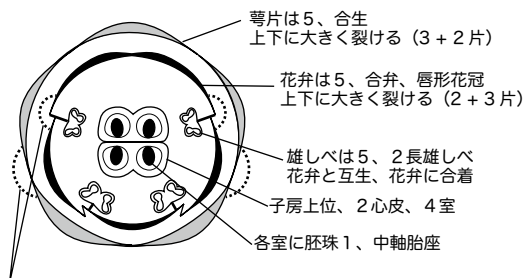
②



ハクサンコザクラ (サクラソウ科)

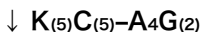


③

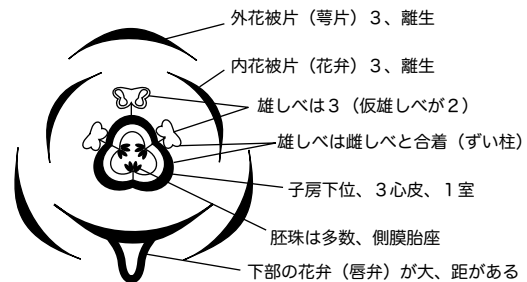


萼と花冠はそれぞれこの部分で大きく裂ける

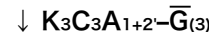
ジャコウソウ (シソ科)



④



ツレサギソウ (ラン科)



生き物の模様:分断色が持つカモフラージュ効果

【担当】

大橋 一晴(12月実施分)kohashi@biol.tsukuba.ac.jp

総合研究棟 A412号室(内線 6657)

横井 智之(1月実施分)tomoyoko@kankyo.envr.tsukuba.ac.jp

生物農林学系棟 B514号室(内線 7282)

もしくは総合研究棟 D319号室(内線 4746)

【目的】

生き物は捕食者から身を守る手段の1つとして、しばしば体色や模様によるカモフラージュを進化させてきた。本実験では、「隠蔽色(背景パターンとの適合)」にくらべて定量的な検証例が少ない「分断色(体の輪郭を捉えにくくする模様)」によるカモフラージュ効果について理解を深める。

【実験の流れ】

人間=「捕食者」が紙に印刷された分断色の模様をもつ生き物の絵=「被食者」を探しあてるまでの時間を測定し、(1)体の輪郭付近に模様があるほどカモフラージュ効果が高い(2)模様の色コントラストが高いほどカモフラージュ効果が高い、という2つの仮説を検証する。細かい実験の手続きについては、実験当日に説明する。

【レポート】

実験結果をグラフにまとめ、分断色のカモフラージュ効果について上記の2つの仮説が支持されたか、そして支持された(あるいはされなかった)理由はどんなものであるか、といった事項について考察したものを各自提出する。詳細は実験当日に説明する。

ショウジョウバエ発生過程における遺伝子発現の観察

担当: 丹羽隆介

E-mail: rniwa@biol.tsukuba.ac.jp

【概要・目的】

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の胚発生過程における幾つかの重要な遺伝子の発現を検出・観察し、生物の発生における遺伝子発現カスケードの重要性を理解する。また、多細胞生物の遺伝子発現を解析するための研究手法の初歩的な知識を学ぶ。

【内容】

キイロショウジョウバエ野生型の胚を固定し、「RNA *in situ* hybridization」と呼ばれる手法によって、胚の外形を保ったまま (whole mount) 遺伝子発現を可視化する。そして、ショウジョウバエの受精卵が分節した体節構造を持つ幼虫へと発生するために必要な「母性効果遺伝子」「ギャップ遺伝子」「ペアルール遺伝子」「分節極性遺伝子」の発現パターンを観察する。

【実験操作】

実習の時間が限られているため、胚の回収と固定、RNA プローブとの hybridization、および抗体とのインキュベーションは事前にこちらで準備する。この事前準備の内容、および下記の手順に書かれた試薬の詳細は、実習実施日に解説する。

(1) PBST Wash

- discard the solution
- add 1 ml PBST
- mix for 2 min at room temperature

- discard the solution
- add 1 ml PBST
- mix for 5 min at room temperature

- discard the solution
- add 1 ml PBST
- mix for 5 min at room temperature

- discard the solution
- add 1 ml PBST
- mix for 5 min at room temperature

(2) Prewash for color detection

- discard the solution
- add 1 ml Detection buffer
- mix for 2 min at room temperature

- discard the solution
- add 1 ml Detection buffer
- mix for 2 min at room temperature

(3) Color Detection with NBT/BCIP

- discard the solution
- add 0.7 ml NBT/BCIP detection solution
- incubate for 30–60 mins
at room temperature until signals develop

(4) Color reaction stop

- discard the solution
 - add 1 ml PBST
 - mix for 2 min at room temperature

- discard the solution
 - add 1 ml PBST
 - mix for 2 min at room temperature

- discard the solution
 - add 1 ml PBST
 - mix for 2 min at room temperature

(5) Mounting on slide

- discard the solution
 - add 100 μ l 80% glycerol in PBS
 - mount carefully on the slide
 - put cover slip with spacer

【レポート】

各遺伝子の発現パターンを観察・スケッチし、レポートとして提出をお願いする予定です。詳細・変更は実習実施日に連絡致します。

気孔のアブシジン酸応答

担当: 三浦謙治

連絡先: 遺伝子実験センター220(内線 6401)

目的: 植物葉に存在する気孔の開閉は植物ホルモンによって調節されているが、その調節過程を観察する。

導入: 植物ホルモンの1つアブシジン酸は、乾燥など植物が外界のストレスを受けると放出されるホルモンである。このアブシジン酸が気孔の開閉にどのような変化をもたらすかを明らかにする。

準備(材料・薬品・器具): 植物体(タバコ)、反応液(10mM MES(pH5.6)、5mM KCl、50 μ M CaCl₂)、アブシジン酸液(反応液+50 μ M アブシジン酸)、スライドガラス、カバーガラス、ビニールテープ、はさみ、顕微鏡

方法

1. シャーレに反応液、アブシジン酸液を入れる(2人1組)。
2. タバコ葉の表側にビニールテープを貼る。葉を手で押さえながらゆっくりとビニールテープをはいていく。
3. 透明な薄い膜状のもの(表皮細胞層)が得られたら、ある程度の大きさに切って反応液、アブシジン酸液に浮かべる。各自3枚ずつ。
4. 時間を記入する(:)。2時間以上放置。2時間放置の間に表皮細胞の観察を行う。
5. 2時間以上経ったら表皮細胞層をのばした状態でスライドガラスにのせ、液をスポイトで1, 2滴垂らす。
6. カバーガラスをそっとのせる。
7. 顕微鏡で気孔を観察する。
8. 5ケずつ気孔をスケッチする。

表皮細胞の観察方法

1. 上記2と同様に行い、薄い膜状のものをスライドガラスにのせる。
2. 0.1% メチルグリーン液又は0.1% サフラニン液をのせる。
3. カバーガラスをのせ、余分な液をキムワイプで取り除く。
4. 顕微鏡で観察する。

報告

1. 表皮細胞の形をスケッチ。またメチルグリーン又はサフラニンで染色された部分を示すこと。
2. メチルグリーン又はサフラニンによって細胞内のどのような組織が染色されたかを調べて記載せよ。
3. 反応液、アブシジン酸液に浸された葉の気孔(各5ケ)のスケッチ。
4. アブシジン酸の化学式を記せ。植物におけるアブシジン酸がどのように気孔の開閉に関与しているかについて自身で調べて考察せよ。

ラン藻の窒素代謝の環境要因による制御

担当: 新家 弘也

araie.hiroya.fe@u.tsukuba.ac.jp

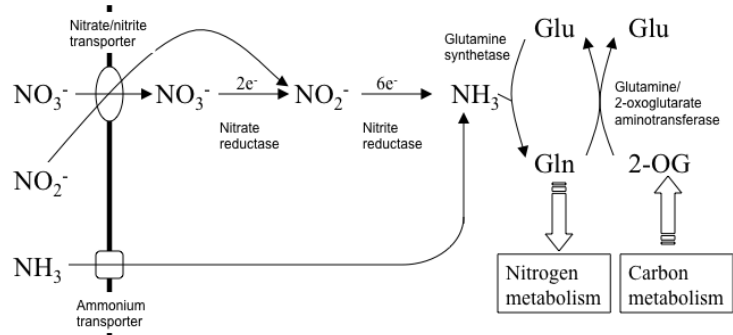
生物農林学系棟 D302 [ex. 4908]

ラン藻(シアノバクテリア)とは

ラン藻は単細胞性の藻類で、植物と同様に光存在下で光合成を行い、水から酸素を発生し二酸化炭素を固定して有機物を合成することにより生育する。光合成の仕組みは真核の藻類や植物の葉緑体と同様であり、ラン藻の祖先が真核細胞に取り込まれ葉緑体に進化したと考えられてきた(細胞内共生説)。近年、葉緑体ゲノム、ラン藻のゲノム、植物の核ゲノムの塩基配列が決定され、それらの相同性から細胞内共生説はより確かなものとして受け入れられている。

ラン藻や植物は光合成の過程で炭素、すなわち二酸化炭素を固定することは良く認知されていると思うが、光エネルギーは炭素の固定のみでなく、その他の元素すなわち窒素、硫黄、リンなどの固定にも利用される。植物や藻類は、光エネルギーを利用し無機化合物から有機化合物を合成して生育できる。これらを独立栄養生物という。それに対して動物や他の微生物のように独立栄養生物が生産した有機物を利用して生育する生物は、従属栄養生物という。光合成により利用できる無機炭素は二酸化炭素しかないけれど、無機の窒素源としてはアンモニア、硝酸、亜硝酸の各イオンが利用可能である。硝酸イオンは細胞内で硝酸還元酵素、亜硝酸還元酵素により亜硝酸イオン、アンモニアへと還元される。アンモニアはグルタミン合成酵素によりグルタミン酸に固定されグルタミンが合成され様々な含窒素化合物の合成に使われる。

一部のグルタミンは炭素固定産物に由来する2オキソグルタル酸へのアミド基転位反応に使われ、グルタミン酸の再生に使われる。この反応は炭素の代謝と窒素の代謝が初めて交わる重要な点で、炭素と窒素のバランスを制御する上で重要である。



この実験では、ラン藻が培地中の窒素(亜硝酸塩)を取り込んでいく様子を測定する。その過程で分光光度計の使い方を習う。硝酸イオンあるいはアンモニウムイオンを窒素源として含む培養液で培養した2種類のラン藻の培養液を準備する。両者について亜硝酸イオンの取込を測定し、硝酸培地で培養した方には途中でアンモニアを添加し、その影響も観察する。

準備:(材料)

アンモニアを窒素源として培養したラン藻(10 mL)、硝酸を窒素源として培養したラン藻(10 ml x 2 本)、事前に窒素源を含まない培養液でよく洗い、窒素源を取り除いておく。(TA が行う)

実験操作:

1. それぞれのラン藻(硝酸培養/アンモニア培養)10 mL に、100 μ L の 10 mM 亜硝酸溶液(最終濃度 100 μ M)を加え**混ぜ**、蛍光灯スタンドの光の下におく。
2. **すぐに** 1 mL を 1.5 mL 遠心管にとり 0 タイムのサンプルとする。**サンプルは水中暗所に置く。**
3. 以後 10 分おきに 1 時間まで同様にサンプルをとる。
4. サンプルの合間に、亜硝酸の検量線を描くため、試験管に表のように 0.1 mM 亜硝酸を加える。各濃度 2 本ずつ用意する(二連で)。

NO ₂ 濃度* (μ M)	0	2.5	5	7.5	10
0.1 mM NaNO ₂ (μ L)	0	75	150	225	300
H ₂ O (μ L)	1000	925	850	775	700

*3 mL 発色液中の亜硝酸イオン濃度

5. 最後のサンプリングの後、15,000rpm で約 2 分間、**遠心機**で細胞を沈殿させる。
6. 細胞を沈殿させた後のサンプルの上清を 300 μ L 試験管にとり、蒸留水を 700 μ L 加える。
7. 4. と 6. で用意した試験管に亜硝酸発色試薬を 2 mL ずつ加え、5 分間程度発色させる。
8. **分光光度計**で 540 nm の吸光度を測定し、検量線を作成し、それに基づきサンプル中の亜硝酸の量を求める。
9. クロロフィル濃度の測定は、TA が行い、当日報告します。

報告:

1. 実験の手順・方法を整理する。
2. 亜硝酸の検量線を描く。
3. 各反応容器中の亜硝酸イオン濃度の経時変化を、求めた検量線から計算する。
4. 各反応容器中の細胞の亜硝酸イオンの取り込み(培地中からの亜硝酸の減少)の経時変化を示したグラフを描く。
5. 硝酸イオンまたはアンモニウムイオンを窒素源として培養した細胞の、亜硝酸取込の経時変化のグラフより、傾き[(μ mol/l)/min]を求め、その値をさらにクロロフィル濃度(mg/L)で割ることにより、クロロフィルあたりの亜硝酸の取り込みの速度(μ mol/min/mg Chl)を計算する。
6. 実験の感想を書いて下さい。
7. レポートは来週の実験の前に集めてもらいます。

タンパク質の電気泳動

担当: 鶴田文憲

連絡先: 総合研究 A 棟 417(内線 6887)

目的:

各班に配布した未知タンパク質の分子量を SDS-PAGE により同定する。

実験試料:

未知分子量タンパク質、ポリアクリルアミド溶液 (Separating ゲル)、ポリアクリルアミド溶液 (Stacking ゲル)、10% APS、TEMED、泳動用バッファー、分子量マーカー、CBB 染色液、脱色液

実験方法:

ゲル板の作製

1. ゲル板を洗浄した後に組み立てる
2. 10%ポリアクリルアミド溶液 (Separating ゲル) 10ml に 10% APS 80 μ と TEMED 10 μ を加え、よく混ぜる (泡立てない)。
4. ゲル溶液をゲル板の隙間に泡立てないように流しこむ (下から 6.5cm くらい)。
5. 水を静かに加え、ポリアクリルアミド溶液が空気に触れないようにする。
6. Separating ゲルが固まったらポリアクリルアミド溶液 (Stacking ゲル) 5ml に 10% APS 40 μ と TEMED 5 μ を加えて、コームをセットしたゲル板に流しこむ。

電気泳動

1. ゲル板からスペーサー、コームを外し、泳動槽にセットする。
2. 泳動バッファーを注ぎ、ゲル板の下側とウェルをよく洗う。
3. サイズマーカー 5 μ とサンプル全量をウェルに入れる。
4. パワーサプライの設定を定電流 40mA・200V にセットし 45 分間泳動する (青い色素が 2/3 ~ 一番下くらいまで移動する)。

CBB 染色

1. 泳動槽からゲル板を取り出し、ゲルをゲル板から注意深くはがす。
2. CBB 染色液で 10 分程度染色する。
3. 脱色液で各バンドが見えるまで脱色する。

レポート:

1. サイズマーカーのバンドの移動度と未知サンプルの移動度の比較から未知サンプルの分子量を計算する。分子量を対数表示にとり、移動距離をもう一方の軸にとる。得られた近似直線と未知サンプルの移動距離の交差点から分子量を同定する。
2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動の原理について説明する。