SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

生命科学に関連した分析機器についての研修

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 静岡大学技術部 公開日: 2013-03-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森内, 良太, 市川, 佳伸 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.14945/00007107

生命科学に関連した分析機器についての研修

○森内良太、市川佳伸
静岡大学技術部　静岡分室　教育研究支援部門

１. はじめに

iPS 細胞研究や相次ぐ生物のゲノム解読など、近年の生命科学分野における研究の発展は特にめざましい。その背景には、分析機器の進歩が大きく貢献していると考えられる。これからはゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクスといった「オームサイエンス」の時代であり、今後ますます分析機器のニーズが高まってくることが予想される。そのような現状を踏まえ、技術職員として生命科学分野の機器に関して一定の知識を備えていることが望ましいと考えた。そこで、同分野で使用されている分析機器に関する基本的な知識と操作技術の修得を目的として、本研修を行った。

２. 研修で使用した分析機器について

2.1. 分析機器の選定

研修の対象とした分析機器は、定量的 PCR 解析装置 LightCycler (Roche 社製)（図 1）と透過型電子顕微鏡 TEM H-7500（日立ハイテクフィールディング）（図 2）である。両機器とも特に汎用的に使用されていると考え、この 2 つを選定した。

図 1　定量的 PCR 解析装置

図 2　透過型電子顕微鏡

2.2. 定量的 PCR 解析装置の概要

PCR とは Polymerase Chain Reaction の略称であり、目的の遺伝子を簡便かつ大量に得ることができる実験手法のことである。PCR は幅広い研究分野で行われているが、定量性はなく、また増幅反応後の電気泳動やエチジウムブロマイド染色において多くの時間を消費してしまう。そのような短所を補うのが、Real-Time PCR である。これは定量的 PCR 解析装置で行う PCR のことで、定量性があり短時間で増幅反応データを得ることができる。さらに PCR に比べ、感度と再現性が高いという特長がある。その原理について、PCR は 1 サイクルごとに目的の DNA 配列が 2 倍ずつ指数関数的に増幅し、やがてプラトーに達する。この増幅の様子をモニタリングした図が、増幅曲線である（図 3)。初発の DNA 量が多いほど、増幅産物量が検出可能な量に達するまでのサイクル数が少なくて良いため、増幅曲線が早く立ち上がってくる。そこで、段階希釈したスタンダードサンプルを用いて Real-Time PCR を行うと、初発 DNA 量が多い順番に等間隔で並んだ増幅曲線が

得られる。ここで適当なところに閾値を設定すると、閾値と増幅曲線が交わる点 Ct 値(Threshold)が算出される。Ct 値と初発 DNA 量の間には直線関係があり、検量線を作成することができる（図 4)。つまり、未知サンプルについてもスタンダードサンプルと同様に Ct 値を算出し検量線に当てはめれば、初期鋳型量を求めることができるという原理である。また PCR 増幅産物の検出は、蛍光により行う。検出方法は一般的に広く使用されるインターカレーター法と、特異性の高い蛍光標識プローブ法の 2 つがあり、実験の目的により使い分ける。

Real-Time PCR の応用例として最も行われているのは、逆転写反応(Reverse Transcription)と組み合わせた定量 RT-PCR である。また医療現場では、感染症進行レベルの判定に使用されている。さらに食品分野や分子生物学分野の研究においても、広く使用されている[1]。

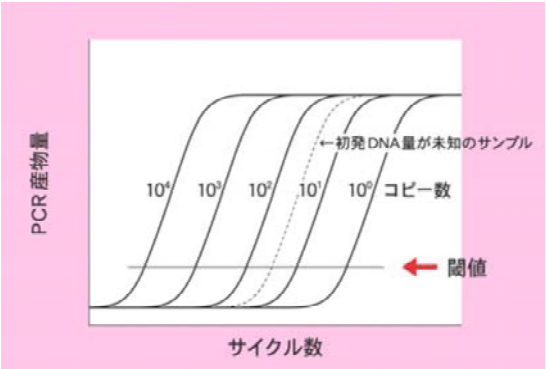

図 3　増幅曲線

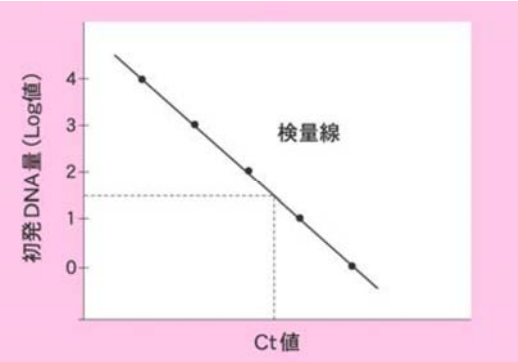

図 4　検量線

2.3. 透過型電子顕微鏡 TEM H-7500 の概要

電子顕微鏡は光学顕微鏡に比べ拡大率が高く、より小さな試料を観察することができる。それは、光学顕微鏡における可視光線の代わりに電子線を、光学レンズの代わりに電磁石を用いているためである。顕微鏡の分解能は用いる光の波長に比例するため、可視光線を使用する光学顕微鏡の分解能は 200 nm が限界であるが、電子顕微鏡は大幅に上げることができる。今回使用した TEM H-7500 では、120 kV の加速電圧で 0.2-0.4 nm の分解能を得られ、50-1,500,000 倍の倍率で観察可能である。TEM は薄く切った試料（20-50 nm）に電子線を照射して透過した電子を結像し、像を得る。そのため、試料の内部構造の観察に優れている[2]。

TEM の使用例としては、金属粒子の観察（図 5）や半導体の結晶構造解析、生物試料における内部構造の観察、免疫標識法によるタンパク質の局在探索（図 6）などに使用されている [3][4]。

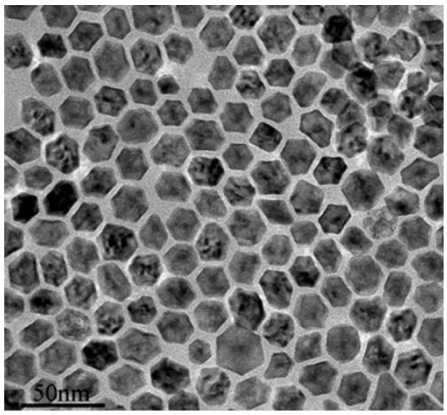

図 5　Pt-Ni 合金の観察

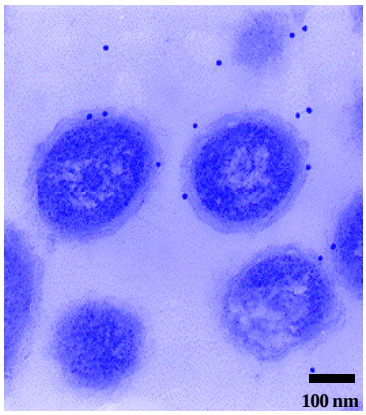

図 6　免疫金標識によるタンパク質の局在探索

３. 定量的 PCR 解析装置の使用法実習

3.1 研修の概要

日時：2012 年 9 月 27 日　10:00-16:00

場所：遺伝子実験施設

参加者：【静岡分室　教育研究支援部門】

宮澤俊義・市川佳伸・井上直己・中西光広・花村憲男・早村俊二・森英樹・森内良太

【浜松分室　情報支援部門】

大橋和義

【学生】

佐藤勝征（修士１年）

3.2 研修内容

まず遺伝子実験施設にある、主な共同利用機器それぞれの原理や使用方法について、道羅英夫准教授の講義を受けた。シーケンサーや共焦点走査型レーザー顕微鏡などの機器が紹介され、特にタンパク質や核酸など高分子の分子量を測定する MALDI-TOF-MS（ブルカーダルトニクス社製）について詳細な説明を受けた。その後、施設内の見学を行った。

続いて、Roche の機器担当者が講師となって実習を行った。今回は SYBR Green Ⅰを用いたインターカレーター法で、Real-Time PCR を行った。テンプレート DNA（ヒトゲノム DNA)、プライマー（β-グロビン)、酵素、SYBR Green Ⅰ、反応ミックス、水（PCR グレード）をピペットマンでキャピラリーに加え混合した。LightCycler にセットし、パソコン上でプロトコルを作成して反応を開始した。反応中に、Real-Time PCR の原理や解析方法を学んだ。今回、実際に得られたデータを図 7、8 に示す。

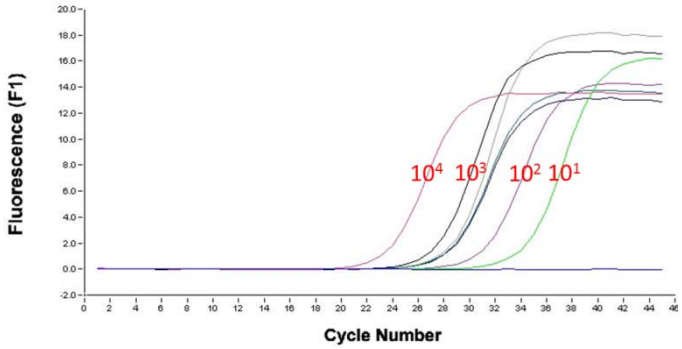

図 7　得られた増幅曲線

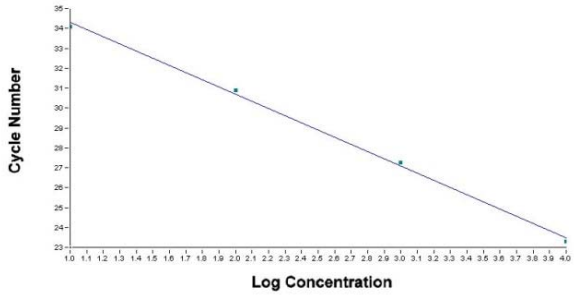

図 8　検量線

４. 透過型電子顕微鏡 TEM H-7500 の使用法実習

4.1 研修の概要

日時：2012 年 11 月 15 日　8:40-16:00

場所：本部別館会議室（講義）・機器分析センター（実習）

参加者：【静岡分室　教育研究支援部門】

宮澤俊義・市川佳伸・井上直己・竹本裕之・中西光広・花村憲男・早村俊二・森英樹・森内良太

4.2 研修内容

まず理学部の鈴木雅一准教授から、TEM H-7500 の基本的なことに関する講義を受けた。具体的

には顕微鏡の歴史や原理、TEM H-7500 の構造と仕様について、試料の調製方法と実際の観察画像の紹介、蛍光抗体法と免疫標識法という内容であった。この講義が TEM に関する導入となり、スムーズに実習へ移行することができた。

続いて日立ハイテクの機器担当者が講師となって、実習を行った。前半は TEM H-7500 の始動と停止方法、加速電圧の印加、照射系と結像系の軸調整、絞りの調整、顕微鏡の操作方法など、講師による説明が中心であった。後半は試料のセッティング、TEM への試料ホルダーの挿入と取り出し、像観察、写真撮影、写真の現像という操作を実際に行った（図 9、10）。

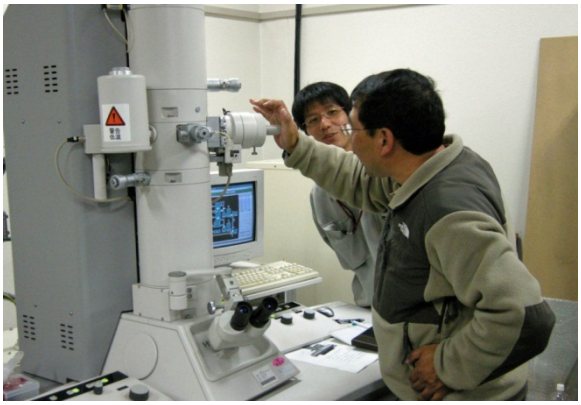

図 9　試料ホルダー挿入の様子

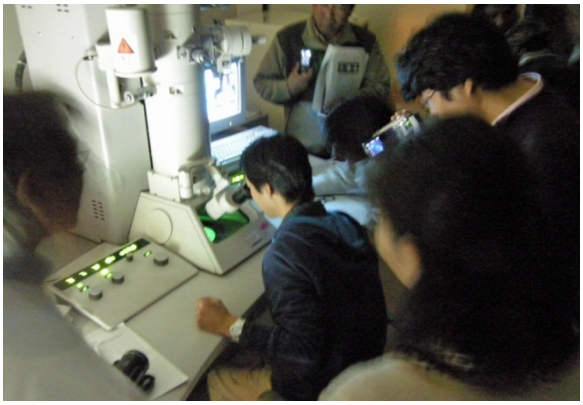

図 10　像観察の様子

５. 研修成果

定量的 PCR 解析装置および TEM の原理と基本的な操作方法を修得できた。また、生命科学分野の分析機器に関する基本的な知見を得ることができた。さらに TEM H-7500 の操作実習をビデオカメラに記録したので、必要があればいつでも見ることが可能である。

６. 今後の課題

今回の研修は実際に試料を持ち寄って測定、観察を行うようなことはしなかった。また講師は教員やメーカーの担当者に委任したため、全体的に機器の原理や操作説明を受け身で聞いている時間が長かったと感じた。技術職員として本格的にこれら機器の維持・管理を行う場合、さらなる発展的な研修が必要になってくると考える。

最後に、遺伝子実験施設の道羅英夫先生、理学部の鈴木雅一先生、施設の職員の皆様、研修に参加して頂いた皆様にこの場をお借りして御礼申し上げます。

参考文献

[1] タカラバイオ:リアルタイム PCR の基礎知識

[2] 日本顕微鏡学会:2011:電顕入門ガイドブック改訂版:国際文献印刷社

[3] **Wang, D. et al.** 2011. General preparation for Pt-based alloy nanoporous nanoparticles as potential nanocatalysts. *Scientific Reports*. 1:37.

[4] **Nagata, Y. et al.** 1999. Two different types of dehalogenases, LinA and LinB, involved in γ-hexachlorocyclohexane degradation in *Sphingomonas paucimobilis* UT26 are localized in the periplasmic space without molecular processing. *J. Bacteriol.* **181**:5409-5413.