

来てみんしゃい！佐賀大学へ 最先端研究設備体験
遺伝子解析コース 当日案内

 開催日

2021年9月23日（木）

余裕をもって
接続しましょう



接続テスト

9:30 アプリ Webex
 ※URLはメールで案内しています

講義

10:00 ・自己紹介
 ・WEB会議の練習
 ・リアルタイムPCRの基礎



10:30 サンプル調製
 ➔研究設備：全自動分注ロボット Andrew+

12:00 昼食



13:30 リアルタイムPCR測定
 ➔研究設備：リアルタイムPCR QuantStudio3

14:30 リアルタイムPCR解析



15:30 まとめ・質問

16:00 終了
 ※実習の進み具合によっては17時頃までかかる可能性があります

 連絡先

佐賀大学 総合分析実験センター
森 加奈恵・徳山 由佳
電話：0952-34-3969 または 090-8395-6168
メール：center-sinsei@ml.cc.saga-u.ac.jp

来てみんなしゃい！佐賀大学へ 最先端研究設備体験

遺伝子解析コース テキスト



1. 自己紹介

2. オンライン授業に慣れよう

3. DNAの基礎知識

4. PCR法の原理

5. PCR産物の検出

6. リアルタイムPCR

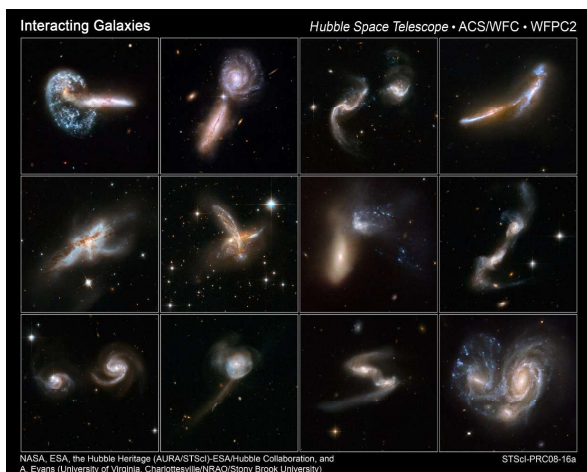
1. 自己紹介



1. 自己紹介

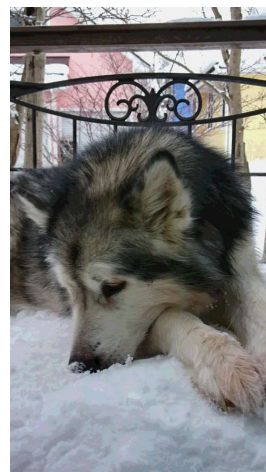
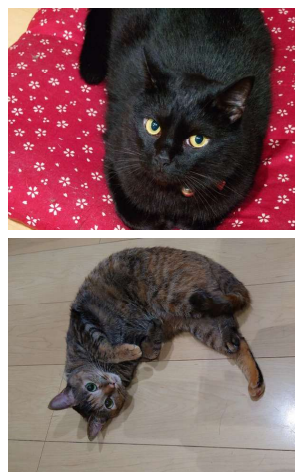
森 加奈恵

出身:福岡県 大牟田市
大学:福岡教育大学 教育学部



徳山 由佳

出身:長野県 上水内郡
大学:九州工業大学 情報工学部



2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

1. 自己紹介

佐賀大学 総合分析実験センター

医学部に設置してある、共同利用研究設備を管理・運営
全学の教職員・学生に対して、研究支援を行う

遺伝子解析・細胞解析・タンパク解析・質量分析

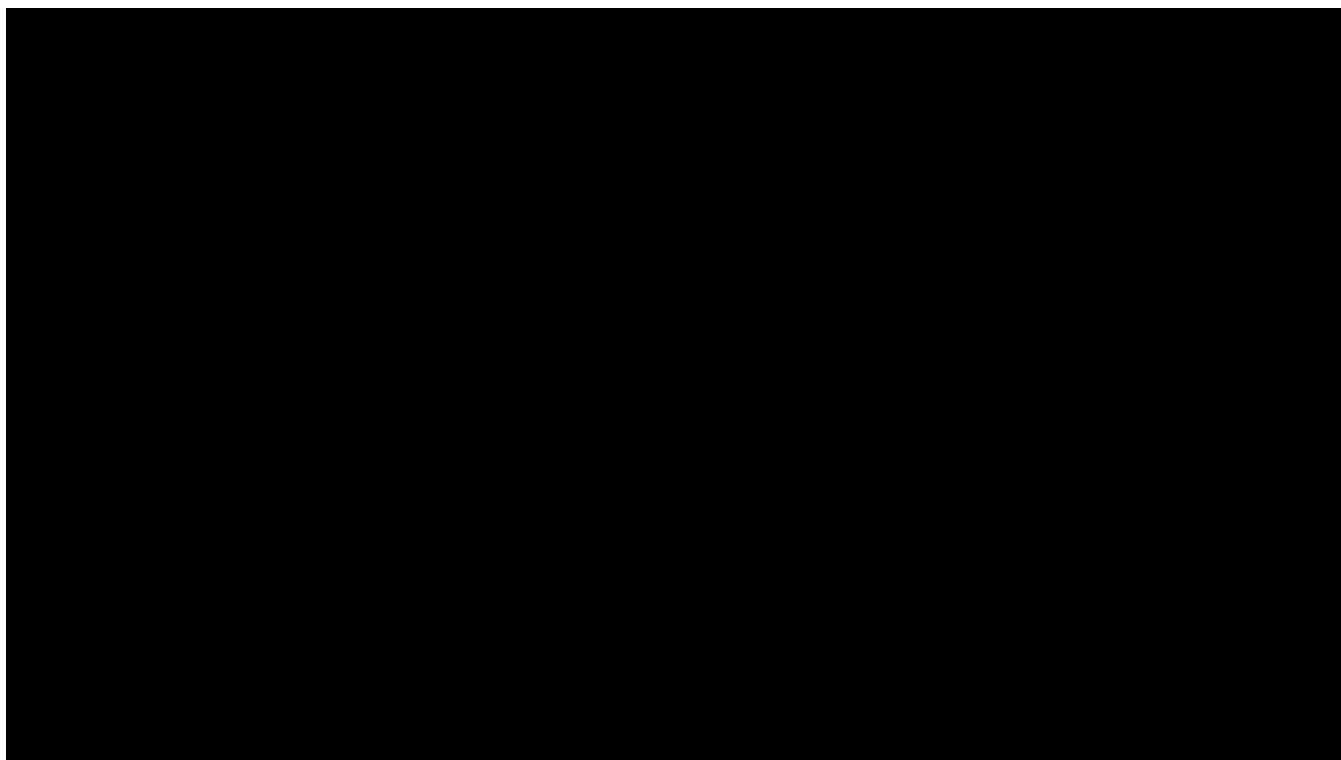
光学顕微鏡・電子顕微鏡

培養室・低温室・滅菌室 etc...



2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

Manabi Fes.



https://www.sao.saga-u.ac.jp/admission_center/ouensite/manabifes/

2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

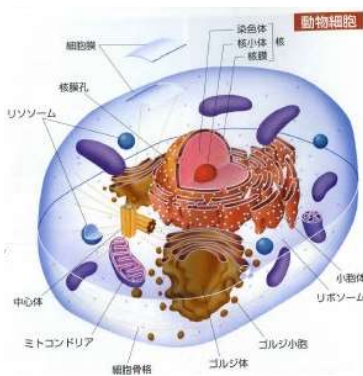
2. オンライン授業に慣れよう

3. DNAの基礎知識

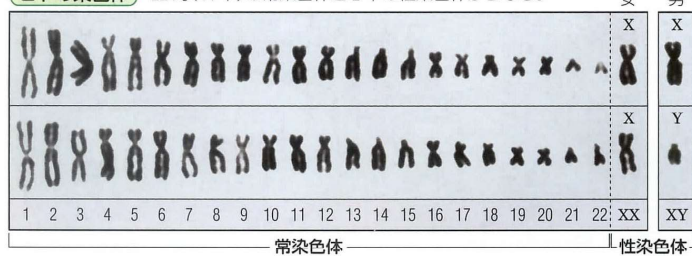


現役の皆さんは、覚えていますよね？

2. DNAの基礎知識



ヒトの染色体 22対(44本)の常染色体と2本の性染色体からなる。



ヒトの細胞1つに含まれているDNAの長さは約190cmである。これが46本の染色体に分かれていることから、1本の染色体には平均4cmのDNAが巻かれていることになる。

染色体

染色質(クロマチン) 染色液で染まる部分

DNA二重らせん構造をもつ P.66

ヌクレオソーム ヒストンにDNAが巻きついた基本構造

ヒストン タンパク質

DNAは二重三重に巻きとられ、極めて圧縮した形で染色体の中に折りたたまれている。

出典: 浜島書店編集部「ニューステージ 新訂 生物図表」2002/11/1発行

2. DNAの基礎知識

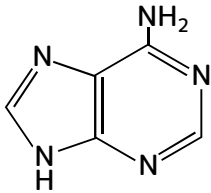
DNAは遺伝子の本体（担体）

リン酸・糖・塩基から成り、**塩基は4種類**ある

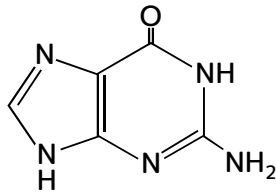
2本のDNA鎖は、塩基の**AとT**、**GとC**が水素結合している



A アデニン



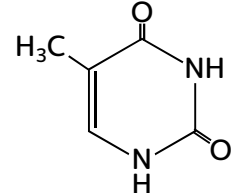
G グアニン



C シトシン



T チミン



2021年9月20日(月)・23日(木)

来てみんなしゃい!!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

4. PCR法の原理

4. PCR法の原理

PCR法=ポリメラーゼ連鎖反応法(Polymerase Chain Reaction)

DNAポリメラーゼによる酵素反応を用いて、
DNAの **一部分だけ** を **選択的に増幅** する方法のこと

※ 連鎖反応

一般に、ある反応における生成物や副産物が
新たに同種の反応を引き起こし、
結果的に反応が持続したり拡大したりする状態

(Wikipedia)



2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

4. PCR法の原理

PCR法=ポリメラーゼ連鎖反応法(Polymerase Chain Reaction)


DNAポリメラーゼによる酵素反応を用いて、
DNAの **一部分だけ** を **選択的に増幅** する方法のこと

キャリー・マリス(Kary B. Mullis)

1985年 PCR法を開発

1993年 ノーベル化学賞受賞

PCR法によりDNAを大量に増幅できるようになり、
医学研究・法医学で非常に重要な手法となった。



サーフィンが大好きで、
受賞の連絡も
サーフィン中に
うけたとか…!

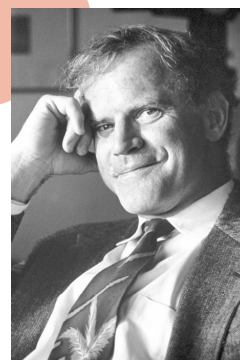


Photo from the Nobel Foundation archive.

出典:THE NOBEL PRIZE <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/mullis/facts/>

2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

4. PCR法の原理

どうやって目的のモノがわかるのか？

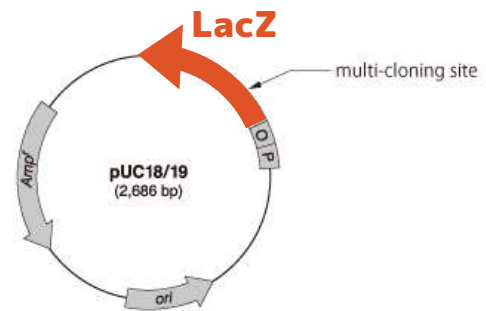
生物には特有・固有のDNA配列がある。

この前後にプライマーを設計すると、

特有・固有のDNA配列を増幅し検出する ことができるので、
目的のモノの定性や定量が可能となる。

今日の実習では

大腸菌のDNA「pUC19」を使います。

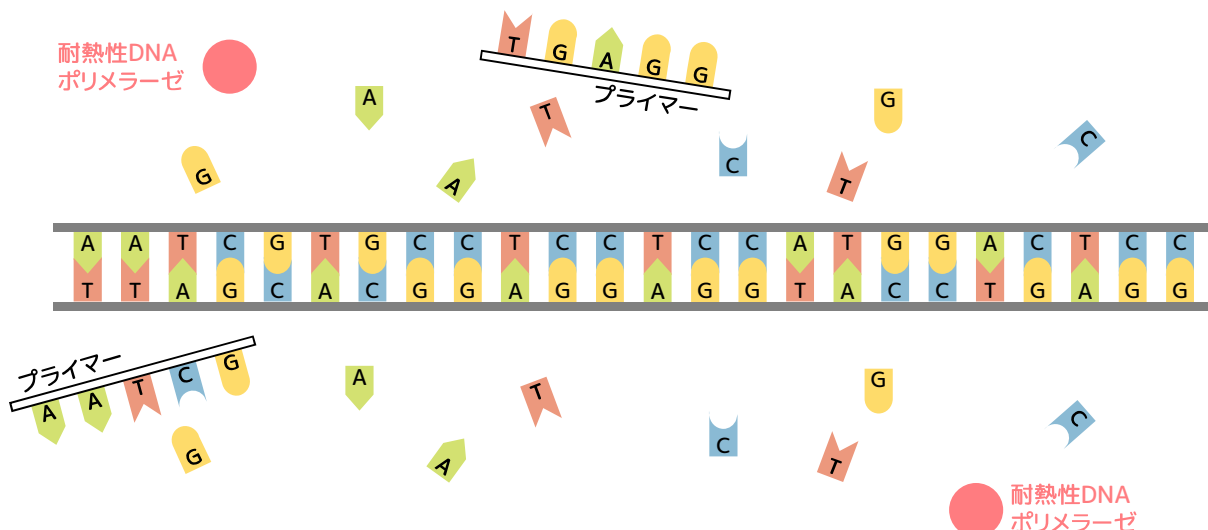


4. PCR法の原理

PCR法=ポリメラーゼ連鎖反応法

① 変性

熱をかけることで、2本鎖DNAは1本鎖にわかれる

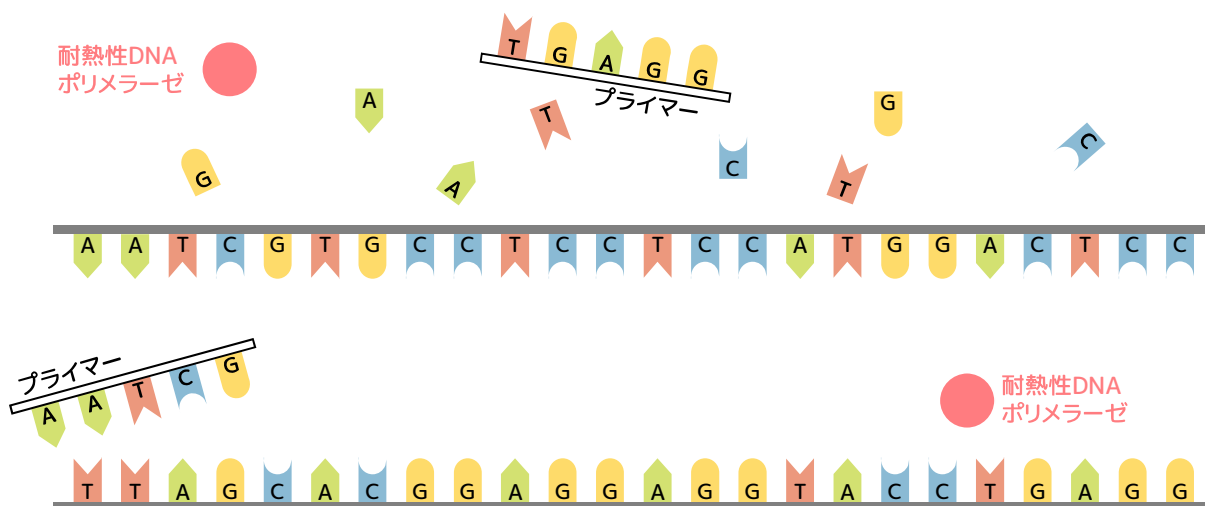


4. PCR法の原理

PCR法=ポリメラーゼ連鎖反応法

① 変性

熱をかけることで、2本鎖DNAは1本鎖にわかれる



2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

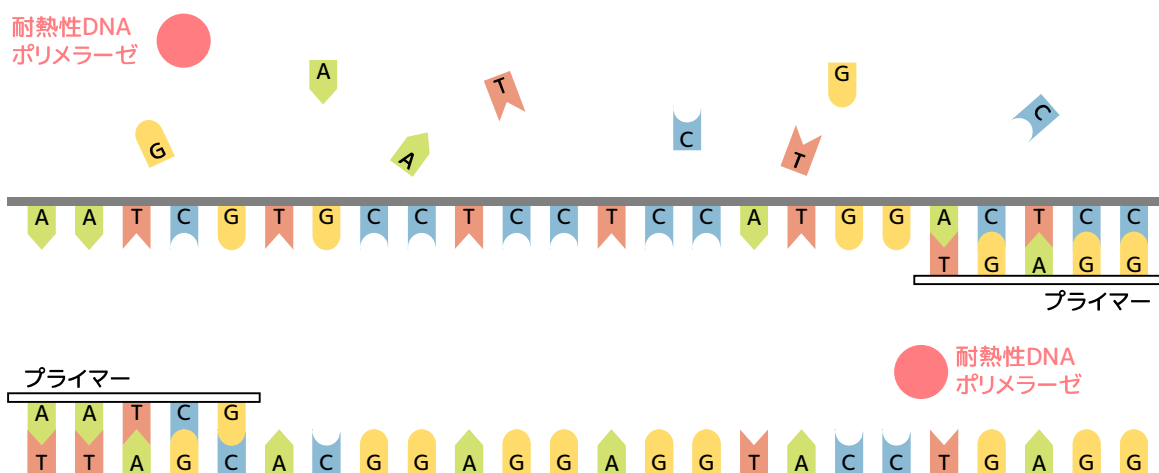
4. PCR法の原理

PCR法=ポリメラーゼ連鎖反応法

① 変性

② プライマーの結合

温度を下げると、優先的にプライマーが結合する



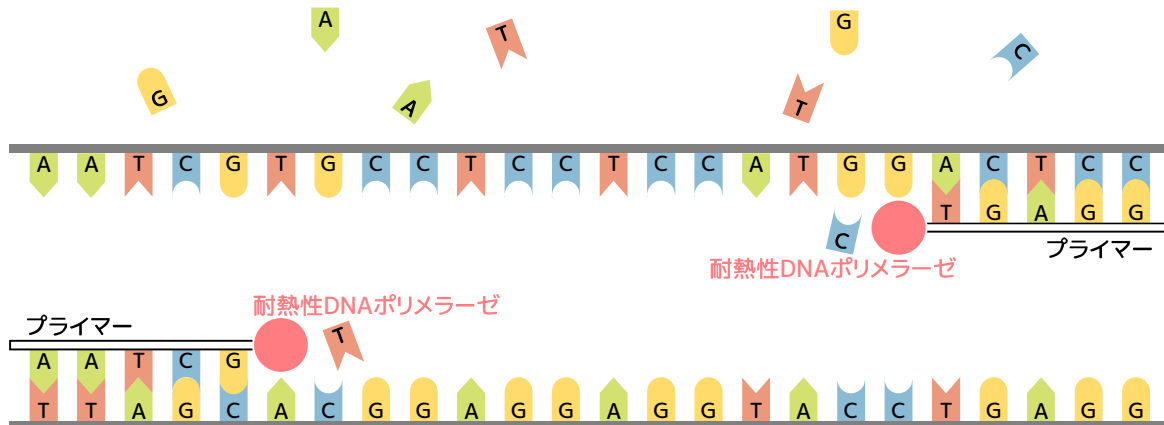
2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

4. PCR法の原理

PCR法=ポリメラーゼ連鎖反応法

- ① 変性
- ② プライマーの結合
- ③ **プライマーの伸長**

温度を上げると、DNAポリメラーゼにより、プライマーが伸長する

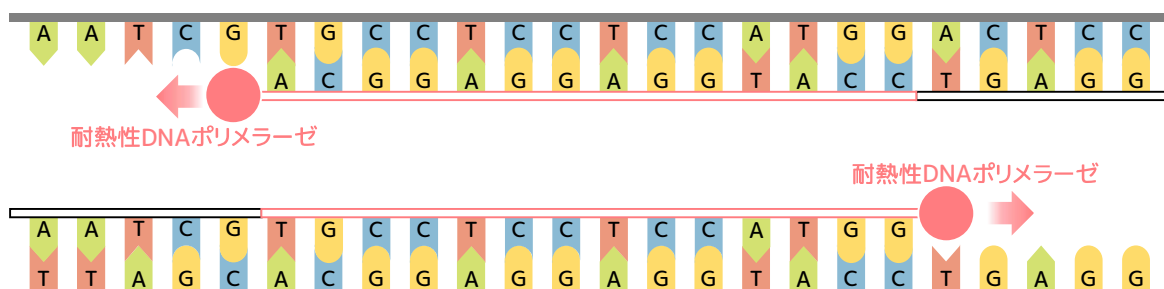


4. PCR法の原理

PCR法=ポリメラーゼ連鎖反応法

- ① 変性
- ② プライマーの結合
- ③ **プライマーの伸長**

温度を上げると、DNAポリメラーゼにより、プライマーが伸長する

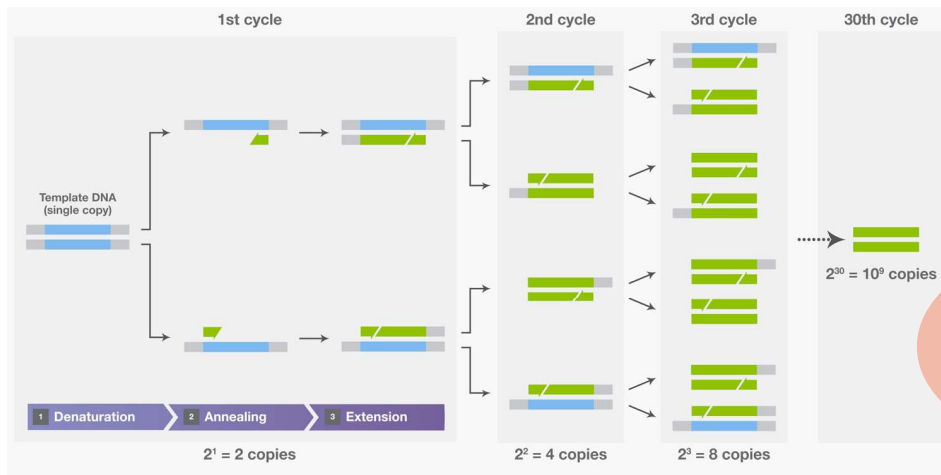


4. PCR法の原理

PCR法=ポリメラーゼ連鎖反応法

- ① 変性
- ② プライマーの結合
- ③ プライマーの伸長

これを繰り返して
DNAを増幅させる



DNA量は
30サイクルで
10億倍に!

出典:サーモフィッシャーサイエンティフィック PCRの基礎知識
<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/pcr-basics.html>

2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

5. PCR産物の検出

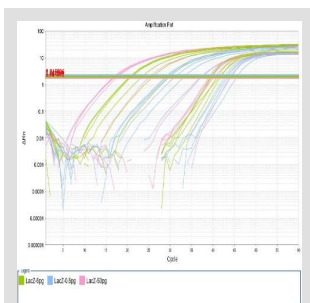


見えないDNAを
どうやって検出すればいいのでしょうか?

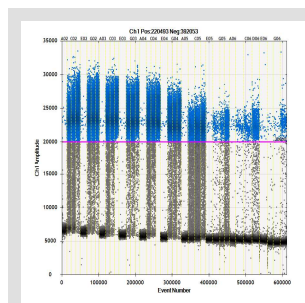
5. PCR産物の検出



PCR
定性的



リアルタイムPCR
相対定量



デジタルPCR
絶対定量



サーマルサイクラー
T-GRADIENT



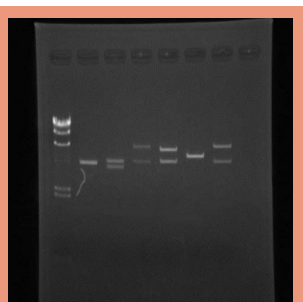
リアルタイムPCR
QuantStudio3



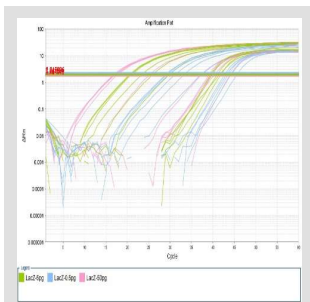
デジタルPCR
QX200

2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

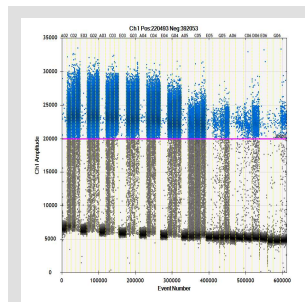
5. PCR産物の検出



PCR
定性的



リアルタイムPCR
相対定量

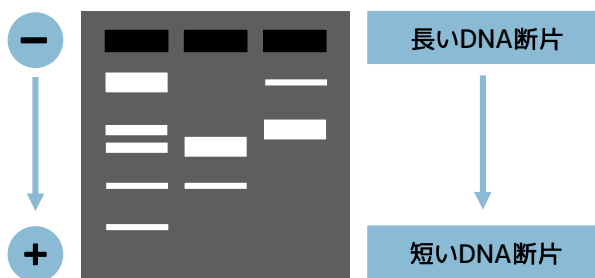


デジタルPCR
絶対定量

アガロースゲル電気泳動法

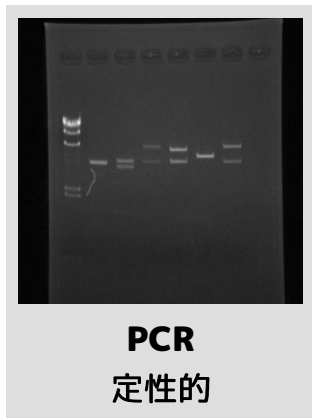
DNAはマイナスに荷電している
→ アガロースゲルに電圧をかけると
プラスに向かって移動する

DNA断片
→ 短いほど早く移動する

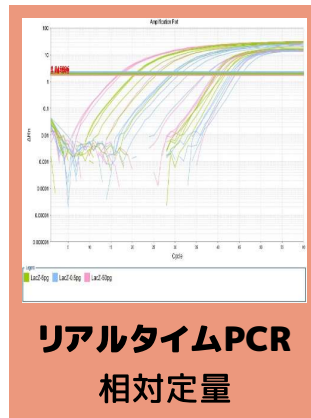


2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

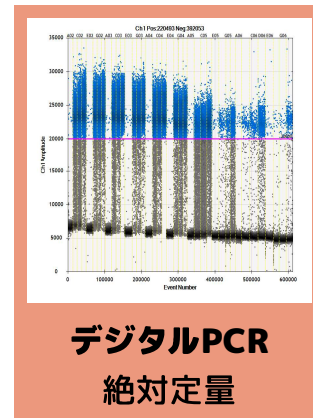
5. PCR産物の検出



PCR
定性的



リアルタイムPCR
相対定量



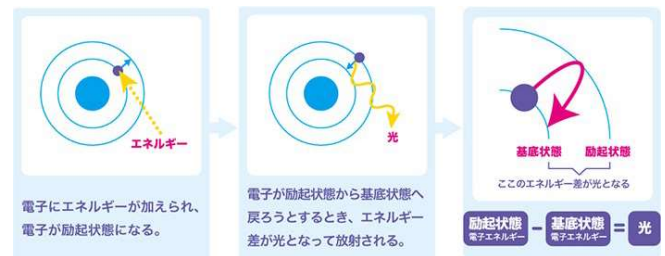
デジタルPCR
絶対定量

蛍光を検出することで定量

蛍光とは・・・

特定の光を吸収して不安定になった物質が、安定状態に戻ろうとして発した光

放出される光の波長は、吸収した光の波長より長くなる



出典: エイエルバイ株式会社 SLD光源とは <https://www.klv.co.jp/technology/what-is-sld.html>

2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

5. リアルタイムPCR

SYBR Green

リアルタイムPCRで利用される
蛍光物質のひとつ

簡便で安価な手法

プライマーが伸長する際、
DNA2本鎖の間に入り込み、
蛍光を発することが
できるようになる

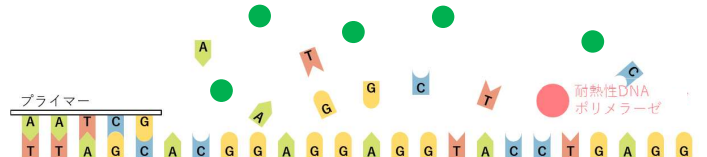
**DNAが増幅するほど
蛍光強度が高くなる**



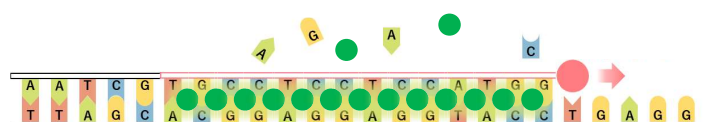
① 変性



② プライマーの結合



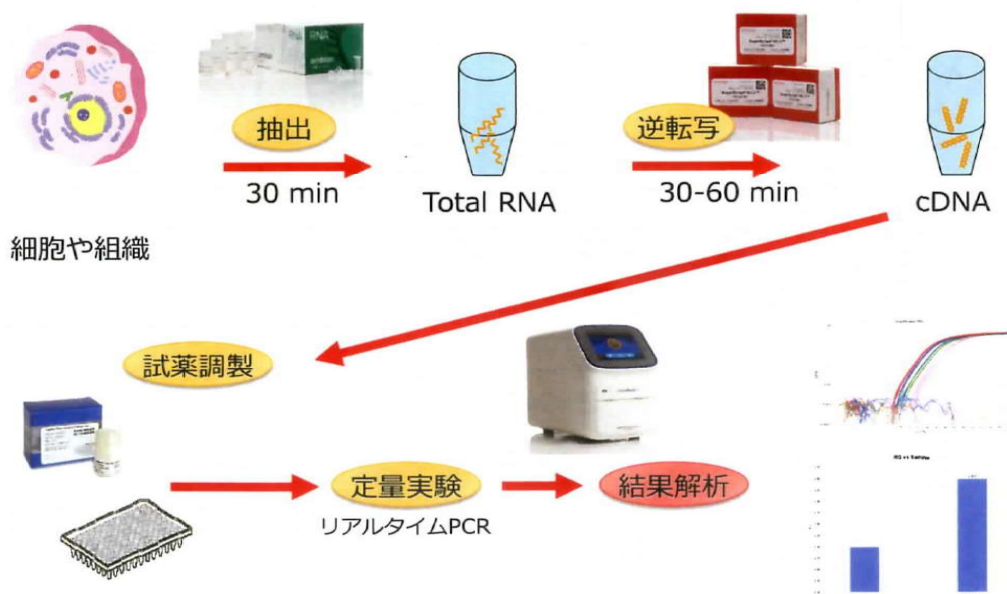
③ プライマーの伸長



2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

5. リアルタイムPCR

一般的な実験の流れ



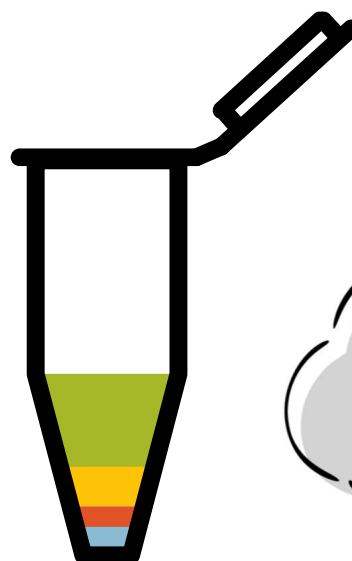
出典: サーマフィッシャーサイエンティフィックライフテクノロジーズジャパン株式会社「初めてのリアルタイムPCR」

2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!! 佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

5. リアルタイムPCR

① 必要なDNA量は?

マスターミックス DNAポリメラーゼ 塩基 蛍光物質	10 μ L
プライマー	$\leq 8\mu$ L
DNA (1 pg ~ 100 ng)	2μL
H ₂ O	variable
total	20 μ L



出典: サーマフィッシャーサイエンティフィックライフテクノロジーズジャパン株式会社 TaqPath qPCR Master Mix, CG <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A15297#/A15297>

2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!! 佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

2021年度 来てみんなしゃい！佐賀大学へ 最先端研究設備体験 遺伝子解析コース 実習手順書

サンプル pUC19 (大腸菌)、 2,686bp

試薬 PowerTrack SYBR Green Master Mix (SYBR Green)
(Thermo Fisher Scientific #A46109)

10 μ M Forward primer (Fw)

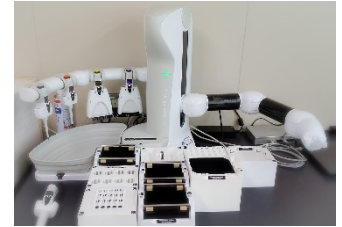
5'- GCT TGT CTG TAA GCG GAT GC -3'

10 μ M Reverse primer (Rv)

3'- CGC AAC GCG AGT GAC GGG CG -5'



研究設備 自動分注ロボット Andrew+ (Andrew Alliance)



リアルタイム PCR QuantStudio3 (Thermo Fisher Scientific)



実験器具

チップ



1.5mL microtube



96 ウェルプレート



50mL conical centrifuge tube



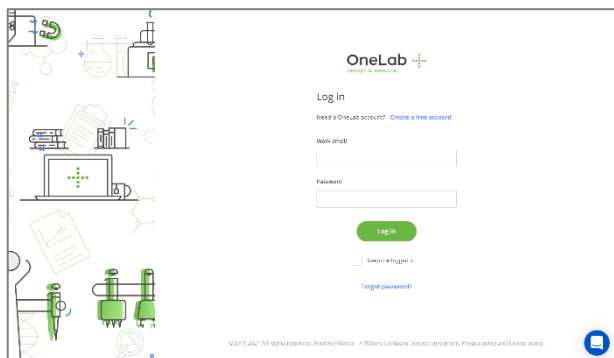
サンプル調製手順

自動分注ロボット Andrew+で分注プログラムを作成する

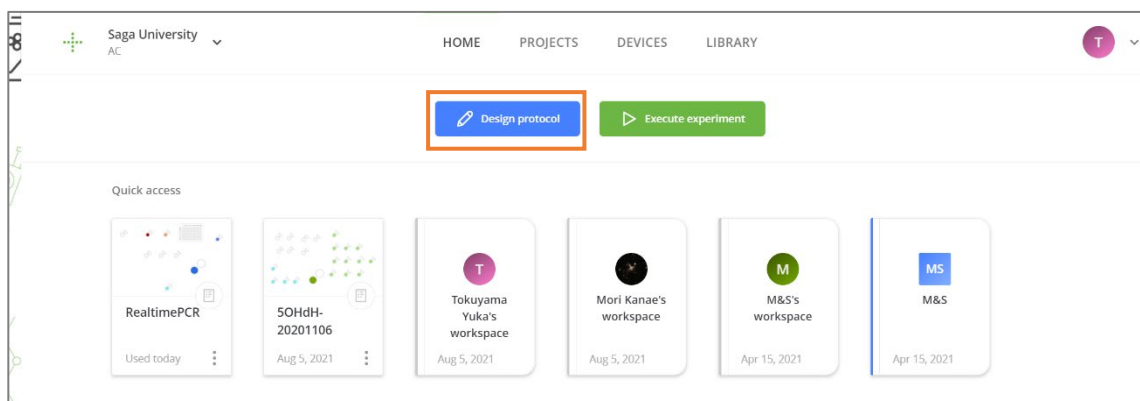
1. OneLab Design & Execute にアクセスする。

<https://onelab.andrewalliance.com/login>

2. Work email、Password を入力し、Log in する。



3. Design protocol をクリックする。




4. stock DNA から 5,000pg/μL、500pg/μL、50pg/μL を下表のように調製するための準備をします。

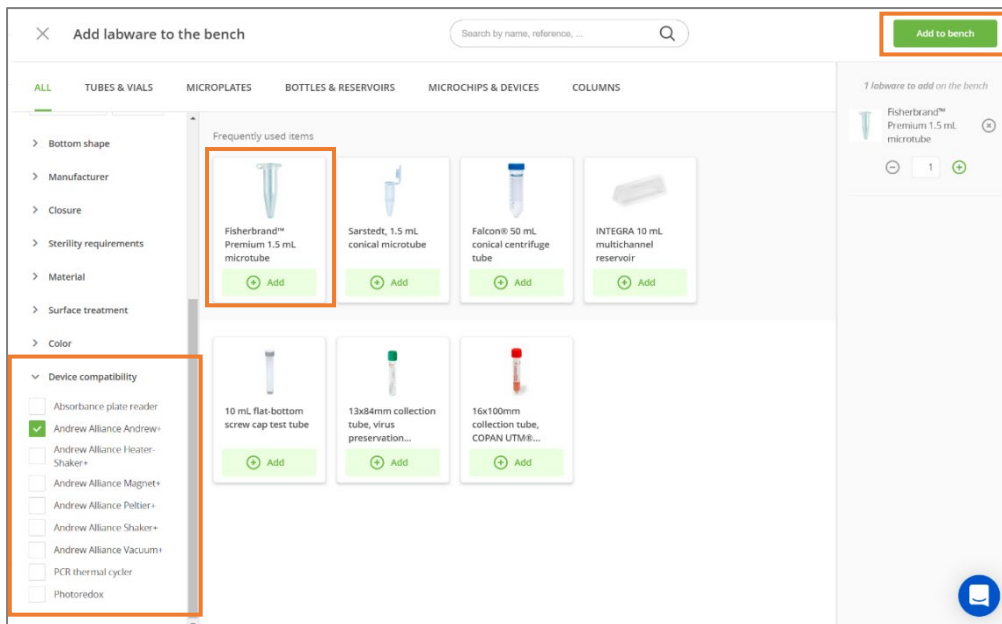
stock DNA 濃度 106.2 ng/μL

DNA 濃度	5,000pg/μL	500pg/μL	50pg/μL
DNA	2.4μL	5μL	5μL
water	47.6μL	45μL	45μL
小計	50μL	50μL	50μL
Yellow Buffer	11.25μL	11.25μL	12.5μL
合計	56.25μL	56.25μL	62.5μL

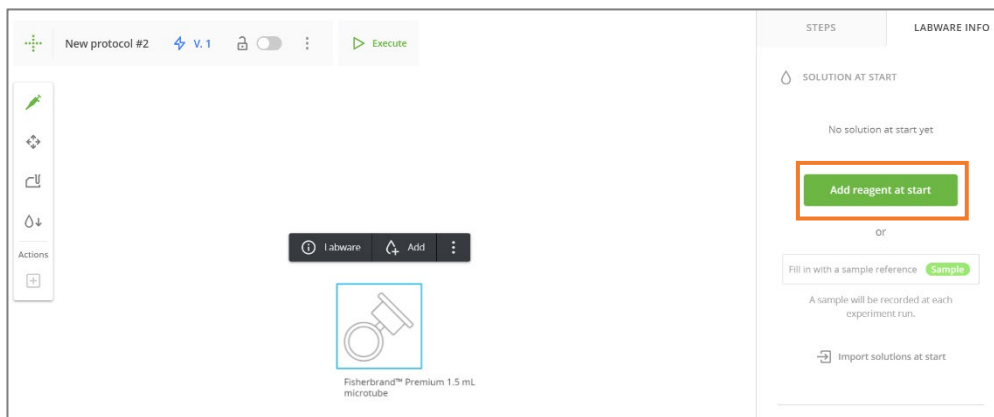
①stock DNA を入れる容器を準備する

 から容器選ぶ

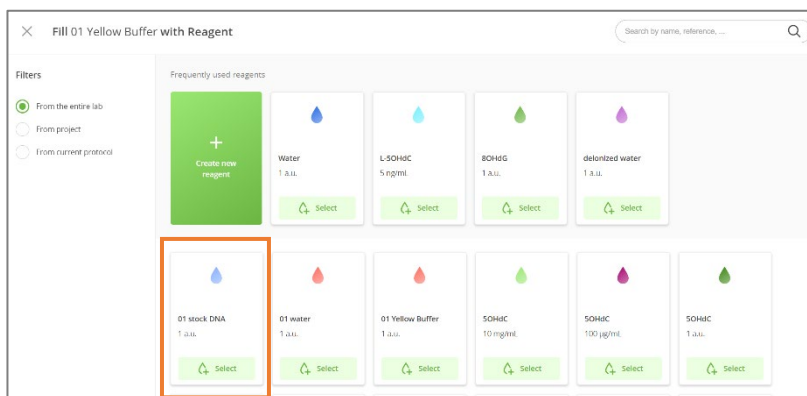
画面左下 Device compatibility から Andrew Alliance Andrew+ を チェック
Fisherbrand Premium 1.5mL microtube をクリックし、Add to bench をクリック



Add reagent at start をクリック



01 stock DNA を選択



Volume に入っている量（ここでは 50 ）を入力



LABWARE INFO の一番下 Comment に cooled と入力

②水を入れる容器を準備

から Falcon 50mL conical centrifuge tube を選択

Add reagent at start から 01 water を選択し、Volume を 40000 に指定

③Yellow Buffer を入れる容器を準備

から 1.5mL microtube を選択

Add reagent at start から 01 Yellow Buffer を選択し、Volume を 50 に指定

Comment に cooled と入力

④DNA 濃度 5,000pg/µL を調製するため、1.5mL microtube を 1 本準備

01 5000pg/µL 選択

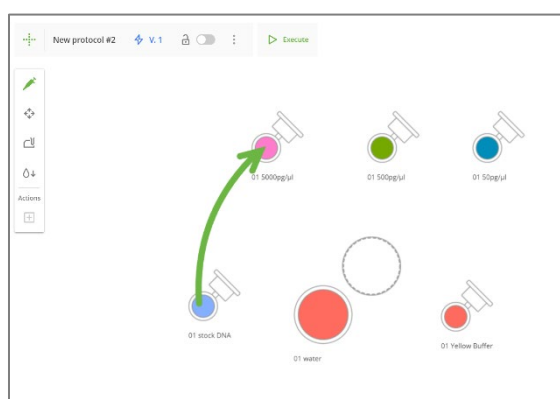
Comment に cooled と入力

※Volume は設定しない

⑤ から Replicate を選び、500pg/µL、50pg/µL の 2 本分を追加

1 solution から、01 500pg/µL、01 50pg/µL をそれぞれ選択

5. 4 番の表のとおり、各溶液を分注します。



①

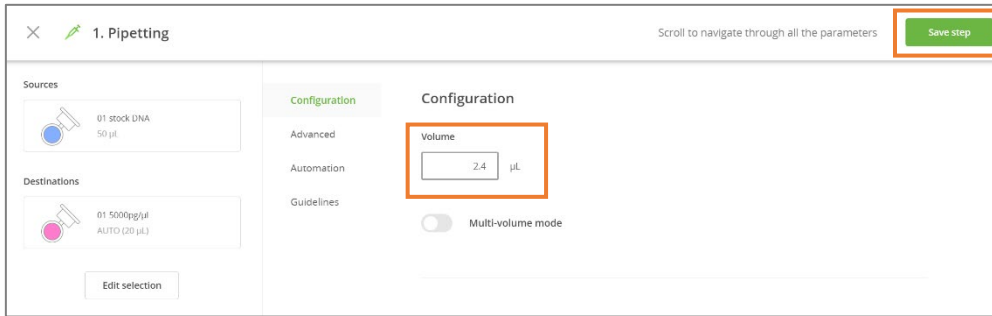
01 stock DNA をクリックしたまま、

01 5000pg/µL へドラッグ

緑の矢印 が表示されます

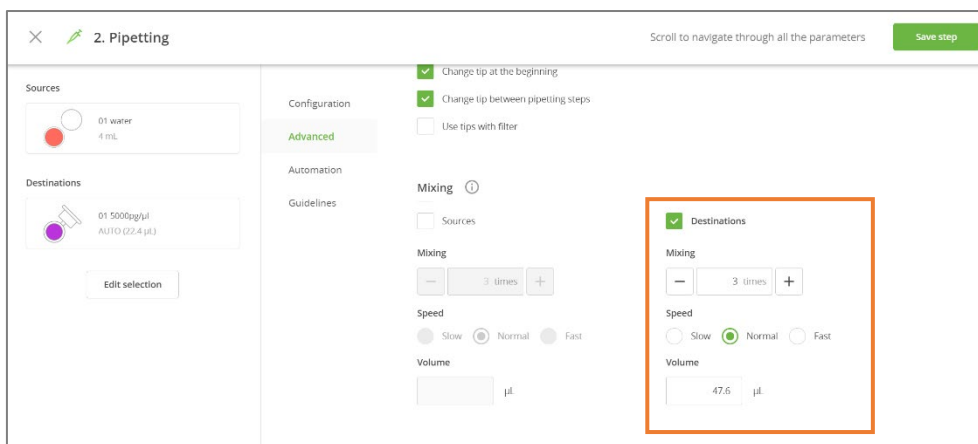
Volume に分注したい量を入力

Save step をクリック



② 01 water から 01 5000pg/μL へ必要量を分注

Mixing の Destinations を し、①で分注した DNA と水を混ぜる（ピペッティング）



③500pg/μL、50pg/μLを調製するようにプログラムする

④01 Yellow Buffer から 01 5000pg/μL、01 500pg/μL、01 50pg/μL へ必要な量を分注し、ピペッティングするようにプログラムする

6. 1.5ml エッペンチューブに反応試薬を下表の通り調製する

Master Mix	60 個分	1 個分
water	378μL	6.3μL
Fw	36μL	0.6μL
Rv	36μL	0.6μL
SYBR Green	600μL	10μL
合計	1050μL	17.5μL

①1.5ml エッペンチューブを 4 本準備

02 Fw を選択し、Volume 55、Comment cooled を入力、

02 Rv を選択し、Volume 55、Comment cooled を入力

02 SYBR Green を選択し、Volume 600、Comment cooled を入力

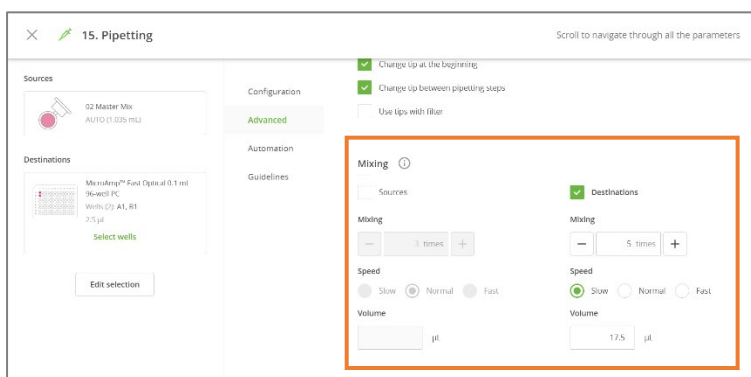
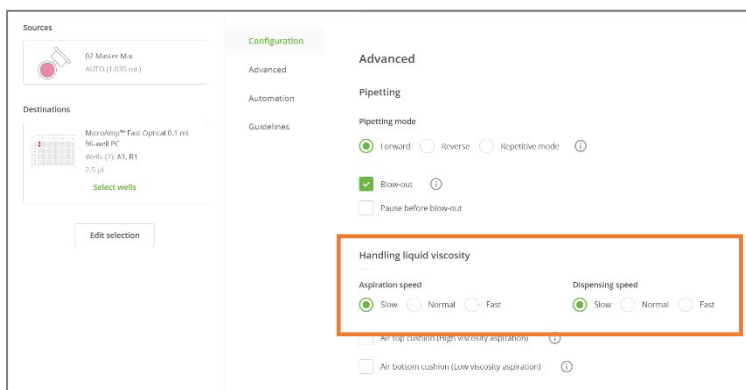
02 Master Mix を選択

② 01 water、02 Fw、02 Rv、02 SYBR Green から 02 Master Mix へ必要な量を分注し、

最後にピペティングするようプログラムする

(注意) 02 SYBR Green、02 Master Mix を使用する場合は、
SYBR Green は、粘性が高いため、ピペットをゆっくり動かす

Handling liquid viscosity の Aspiration speed と Dispensing speed は Slow を選択する
Mixing は 5 times とし Speed は Slow を選択する



7. 96 ウェルプレートに各濃度の DNA と Master Mix を下表の通り混合するようにプログラムする。

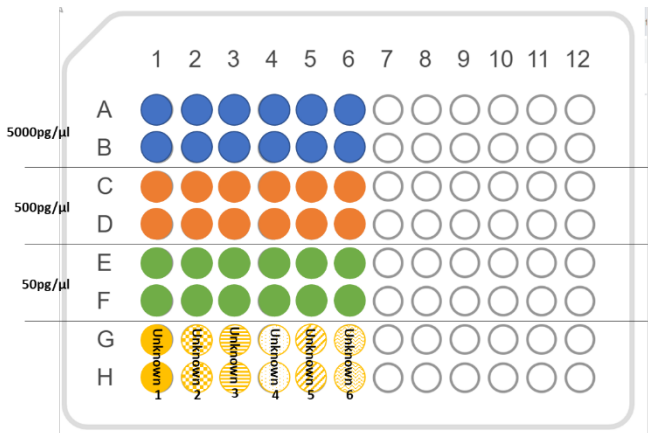
No.	①	②	③	④
5,000pg/μL	2.5μL	—	—	—
500pg/μL	—	2.5μL	—	—
50pg/μL	—	—	2.5μL	—
Unknown	—	—	—	2.5μL
Master Mix	17.5μL	17.5μL	17.5μL	17.5μL
合計	20μL	20μL	20μL	20μL

①Unknown を入れる 1.5mL microtube を 3 本準備

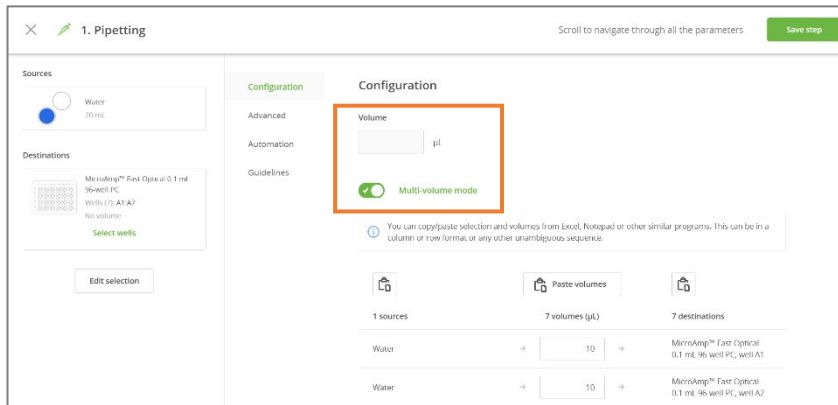
03 Unknown1、03 Unknown2、03 Unknown3 を選択し、Volume 50 を入力

②96 ウェルプレートとして MicroAmp Fast Optical 0.1ml 96-well PCR plate を準備

下図の通りに、分注できるようにプログラムする

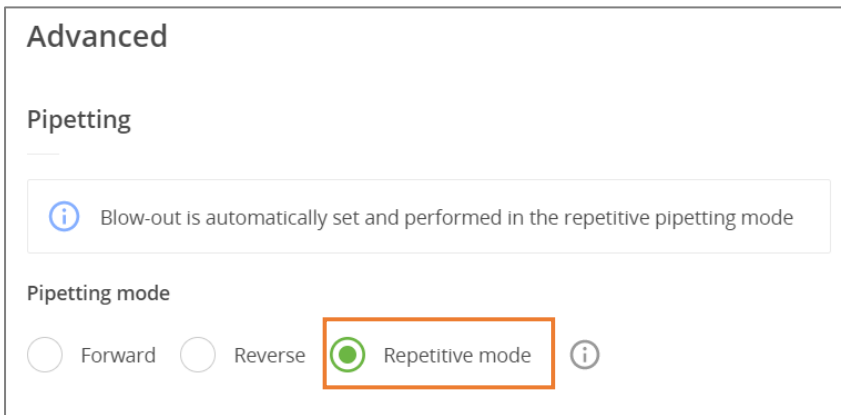


02 Master Mix を A1~H6 まで分注



※同じ溶液を同量ずつ分注する時


Volume に量を入力
Multi-Volume mode を ON



Pipetting mode から
Repetitive mode を選択

A1~A7 まで 01 5000pg/μL を続けて分注し、ピペッティングで混ぜる
これを F 行まで繰り返す

03 Unknown1~6 を G1~H6 まで 2 か所ずつに分注し、ピペッティングで混ぜる

8.  を押して、作ったプログラムを自動分注ロボット Andrew+へ送信

必要な時間が表示されたら、プログラム実行可能

Andrew+ をクリック

Material list に従って、必要なものを確認

 Continue

を押して、次に進む

画面の指示に従って、ドミノ、サンプル等を並べる

 Start experiment

を押して分注を開始

9. サンプルが入っているウェルは、蓋をする。

10. 各ウェルにサンプルが入っているか確認

11. 氷の上にサンプルを静置

リアルタイム PCR 測定手順

リアルタイム PCR QuantStudio3 で測定プログラムを作成し、測定開始する

1. Connect Your Lab にアクセスする。

<https://apps.thermofisher.com/>

2. Design and Analysis New  をクリック

3. 【Open File...】 > 【Personal Files】 > 【20210920.edt】 または 【20210923.edt】 > 【Import】
※参加日のファイルを選択

4. 【Run Method】に PCR の温度条件を設定する

Reaction Volume : [20] μL 測定するサンプルの量

Heated Cover Temperature : [105.0] $^{\circ}\text{C}$ マイクロプレート上部の温度

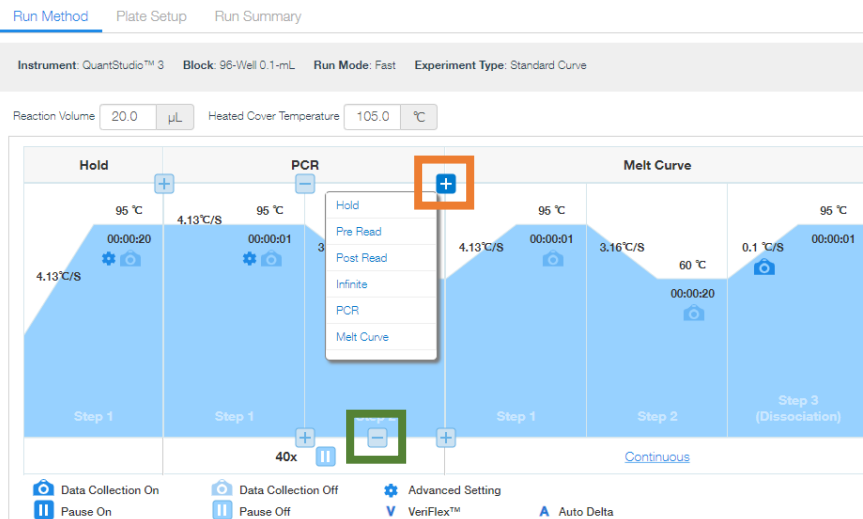
Hold Step1 95 $^{\circ}\text{C}$ 00:20

PCR Step1 95 $^{\circ}\text{C}$ 00:05

Step2 60 $^{\circ}\text{C}$ 00:30 カメラアイコンクリック

40 \times

Melt Courve ※デフォルト条件のまま



【+】条件や Step の追加

【-】条件や Step の削除

5. 【Plate Setup】に各ウェルのサンプルを設定する

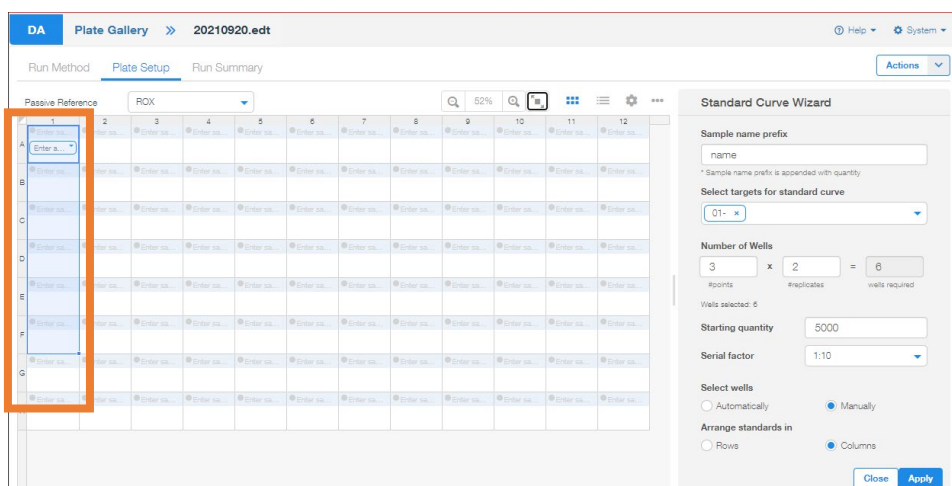
①基準となる濃度のサンプルを設定する

【…】 > 【Standard Curve Setup】

②Standard Curve Wizard に設定する

- Sample name prefix [空白で OK]
- Select targets for standard curve [自分の名前を選択]
- Number of Wells [3] × [2] = 6
- Starting quantity [5000] 基準濃度
- Serial factor [1:10] 希釈倍率
- Select wells [Manually]
- Arrange standards in [Columns]

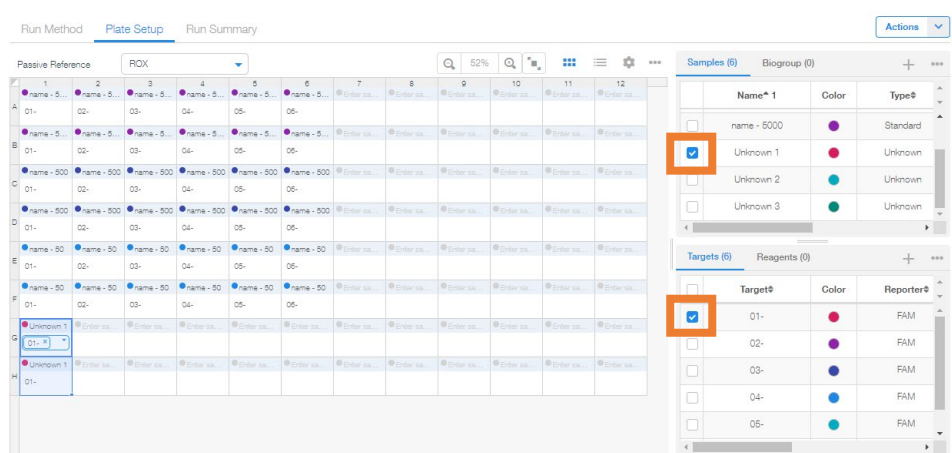
③左側のレイアウトで、入力したいウェルをドラッグで選択する



④Sample name prefix と Select targets for standard curve を変更して、全員分入力する

⑤【Close】クリック

⑥入力したいウェルをドラッグで選択してから、【Samples】と【Targets】を選択

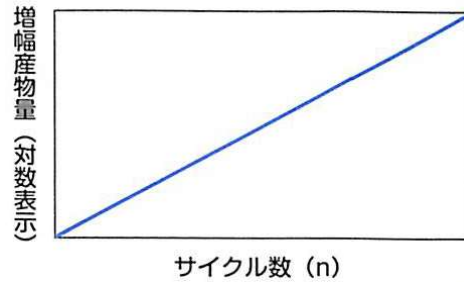


6. **【Run Summary】** で設定条件を確認
7. **【Save Plate File】** クリック
8. 調整したサンプルを持って、リアルタイム PCR の部屋に移動する
9. 遠心機でウェルの中にある気泡を抜く
10. リアルタイム PCR QuantStudio3 の電源を入れる
11. 右上のアイコンをタッチして、96 ウェルプレートを実験室にセットする
12. 作成したプログラムを選択し、測定開始
13. 測定終了したら、データを保存
14. 右上のアイコンをタッチして、96 ウェルプレートを実験室から取り出す

リアルタイムPCRの結果

理論的には、片対数グラフで
直線的に増加するはず

n 回後のPCR産物量=初期濃度 $\times 2^n$



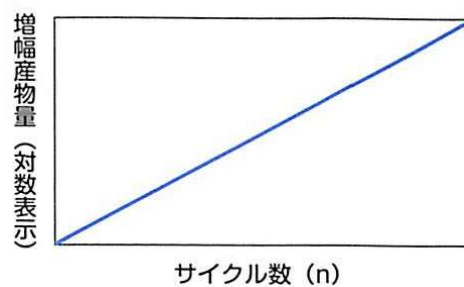
出典:北條浩彦「原理からよくわかるリアルタイムPCR完全実験ガイド」2013/10/10 改訂版発行

2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

リアルタイムPCRの結果

理論的には、片対数グラフで
直線的に増加するはず

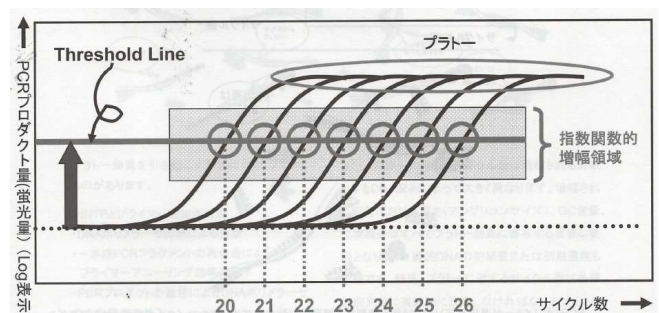
n 回後のPCR産物量=初期濃度 $\times 2^n$



出典:北條浩彦「原理からよくわかるリアルタイムPCR完全実験ガイド」2013/10/10 改訂版発行

初期は検出器の検出限界以下、
後期はPCR効率による
プラトー現象が起こるため
グラフは曲線となる

PCR産物量と蛍光検出量は**相関**する



出典:QuantStudio1/3/5 リアルタイムPCRシステム 研修補足資料(Thermo Fisher Scientific)

2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

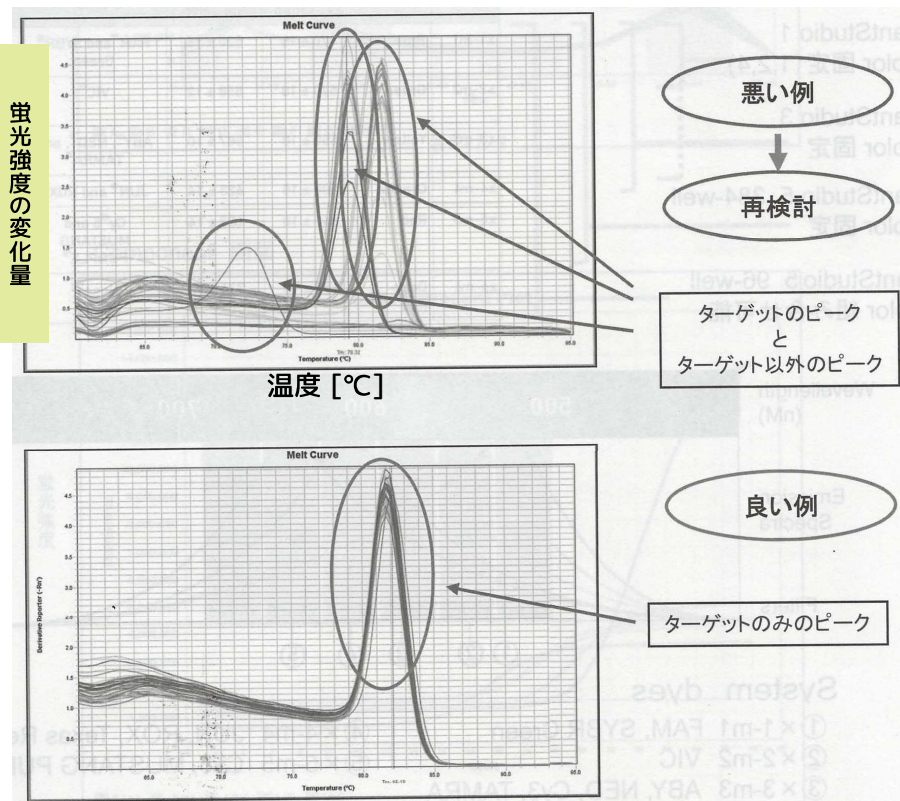
結果の評価

Melt Curve (融解曲線)

温度に対して、
蛍光強度を微分して
「変化量」を表したグラフ

もしも、
目的と違うDNAが
増幅していたら、
ピーク的位置が変わる

ピーク的位置が
同じかどうか
必ず確認する



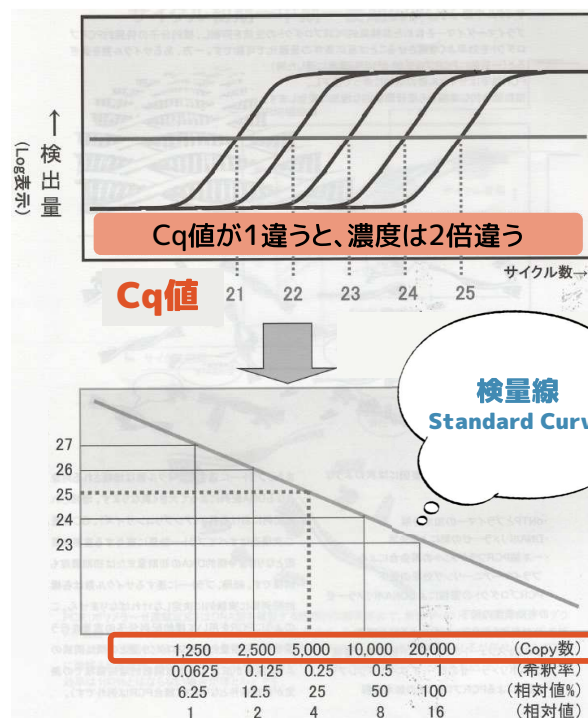
2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんない!! 佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

定量方法

閾値線との交点となるサイクル数を
Cq値 (Quantification Cycle) という

もとのサンプルのDNA量が多いほど、
Cq値が小さく、
もとのサンプルのDNA量が少ないほど、
Cq値が大きい

Cq値によって**相対的に濃度を算出**
することができる



出典: QuantStudio1/3/5 リアルタイムPCRシステム 研修補足資料 (Thermo Fisher Scientific)

2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんない!! 佐賀大学へ 最先端研究設備体験-遺伝子解析コース-

リアルタイム PCR 解析手順

リアルタイム PCR QuantStudio3 で測定した結果を解析する

1. Connect Your Lab にアクセスする。
<https://apps.thermofisher.com/>
2. Design and Analysis New をクリック
3. 【Open File...】 > 【Personal Files】 > 【20210920.eds】または【20210923.eds】 > 【Import】
※参加日のファイルを選択
4. Quality Check タブで、【Amplification Plot】と【Melt Curve Plot】を確認する
5. Standard Curve タブで、検量線を確認する

リアルタイム PCR の結果をまとめましょう

1. Cq 値を読み取る (threshold:)

DNA 濃度	5,000pg/μL	500pg/μL	50pg/μL	Unknown
Cq 値				
平均				

2. 検量線はどんなグラフでしたか？ 書き写してみましよう。

3. Unknown サンプルの DNA 濃度をグラフから読み取りましよう。

Unknown	
平均	
正解	

$$e = 10$$

$$e+3 = 10^3 = 1000$$

この表現は、プログラム上で指数を
標記するために用いられる

4. 正解の濃度を聞いて、今回の結果から何が考えられるでしょうか。考察してみましよう。