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



※URLはメールで案内しています

10 : 00	講義 ・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
	佐賀大学 総合分析実験センター



在員へ子 総合力和実験センター 森 加奈恵・徳山 由佳 電 話:0952-34-3969 または 090-8395-6168 メール:<u>center-sinsei@ml.cc.saga-u.ac.jp</u> 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 テキスト 0

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

T



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



德山 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-



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...









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



2. DNAの基礎知識

動物細胞

ゴルジ体

リソソーム

these

ミトコンドリア

細胞骨格





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=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

(Wikipedia)

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



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。



Photo from the Nobel Foundation archive.

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…!

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-



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 產	物の検出	
ju ju ju ju ju ju ju ju ju ju ju ju ju j		<section-header></section-header>
定性的	相対定量	絶対定量
T-GRADIENT	QuantStudio3	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-	
2021年9月20日(月)・23日(木) 来てみんしゃい!佐賀大 5. PCR庭		
<section-header></section-header>		
<section-header></section-header>		<section-header></section-header>
		<image/> <section-header><section-header></section-header></section-header>
	www.sexamon.estables.establ	<section-header></section-header>

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產	物の検出	
	spanning spa	
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
ー・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	った物質が、	モー 電子が励起状態から基底状態へ 展ろうとするとき、エネルギー 差が光となって放射される。 画品状態 ここのエネルギー差が光となっ
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PCF	8
SYBR Green	① 変性	● 蛍光物質
リアルタイムPCRで利用される 蛍光物質のひとつ	73/7- C C	T G C C C C C C C C C C C C C C C C C C
簡便で安価な手法	T T A G C A C	G G A G G A G G T A C C T G A G
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	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-

2021 年度 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 実習手順書

<u>サンプル</u> pUC19 (大腸菌)、 2,686bp

- - 10μM Forward primer (Fw) 5'- GCT TGT CTG TAA GCG GAT GC -3'

 $10 \mu M$ Reverse primer (Rv) 3'- CGC AAC GCG AGT GAC GGG CG -5'

<u>研究設備</u> 自動分注ロボット Andrew+(Andrew Alliance)









実験器具



チップ

1.5 mL microtube







 $50 \mathrm{mL}$ 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。

Log in Need a Onsular account: Create a free account
Wek and I
Ligin
Generalized in Farget package
V2011 2012 All Historics. Anamer Allians: Articles Company, Sanka spreament, Privacy policy and Comine policy.

3. Design protocol をクリックする。

8 +	Saga University 🗸		HOME PROJ	ECTS DEVICES	LIBRARY		•
			🖉 Design protoc	ol 🕞 Execute exp	eriment		
	Quick access						
	***	****	•	•	Μ	MS	
	RealtimePCR	50HdH- 20201106	Tokuyama Yuka's workspace	Mori Kanae's workspace	M&S's workspace	M&S	
	Used today	Aug 5, 2021	Aug 5, 2021	Aug 5, 2021	Apr 15, 2021	Apr 15, 2021	

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	$500 \mathrm{pg/\mu L}$	50pg/μL
DNA	<mark>2.4</mark> μL	5 μL	π 5μL
water	<mark>47.6</mark> μL	45µL	45µL
小計	50μL <mark>●</mark>	50μL ●	50µL
Yellow Buffer	11.25µL	$11.25 \mu L$	12.5µL
合計	$56.25 \mu L$	$56.25 \mu L$	$62.5 \mu L$

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

Bottom shape Frequently used items Image: Preduction definition definite definite definition definition definite definition d	Bottom shape					
Manufacturer Cosure Seefligy requirements Material Surface treatment Color Perice compatibility Aborthance plate reader Addrw Milance Adirews Addrw Milance Adirews Addrw Milance Neuter		Frequently used items				Premium 1.5 mL microtube
Closure Sterlity requirements Material Surface treatment Color Portice compatibility Absorbance plate reader Andrew Allaince Ardrew: Andrew Allaince Patier: Andrew Allaince Valuer:	Manufacturer	T	1			⊙ 1 ⊙
Sterlity requirements Fiberbrand** Material Image: Add Material Image: Add Image: Add <	Closure	V	V			
Material Surface treatment Color Device compatibility Absorbance plate reader Andrew Alliance Nature	Sterility requirements	Fisherbrand™ Premium 1.5 mL microtube	Sarstedt, 1.5 mL conical microtube	Falcon® 50 mL conical centrifuge tube	INTEGRA 10 mL multichannel reservoir	
Surface treatment Color Pecke compatibility Absorbance plate reader Andrew Aliance Neatee- Shaker* Andrew Aliance Neatee- Andrew Aliance	Material	() Add	(Add	(+) Add	(+) Add	
Color Device compatibility Absorbance plate reader Andrew Allance Andrew+ Andrew Allance Rester- Staker* Andrew Allance Patier+ Andrew Allance Patier+ Andrew Allance Patier+ Andrew Allance Stake* Andrew Allance Stake* Andrew Allance Stake*	Surface treatment					
Device compatibility 10 mL flab bottom 138 årm collection 161 flomm Andrew Allance Adrew+ 10 mL flab bottom 138 årm collection 161 flomm Andrew Allance Adrew+ Image: Add Image: Add Image: Add Andrew Allance Patier+ Add Image: Add Image: Add Andrew Allance Shake+ Image: Add Image: Add Image: Add	Color					
Device compatibility 10 mL flac bottom scree cap test tube 13x84mm collection tube, virus collection tube, collection tube, collectio	Color	1 T				
Absorbance plate reader 10 mt. flat-bottom 13x84mm collection tbk virus Andrew Alliance Plater I om t. flat-bottom 13x84mm collection tbk virus Andrew Alliance Nater I om t. flat-bottom I om t. flat-bottom collection t. bb, virus Andrew Alliance Plater I om t. flat-bottom I om t. flat-bottom collection Andrew Alliance Plater I om t. flat-bottom I om t. flat-bottom collection Andrew Alliance Shaker I om t. flat-bottom I om t. flat-bottom collection Andrew Alliance Shaker I om t. flat-bottom I om t. flat-bottom collection	Device compatibility		1			
Andrew Alliance Andrew: screw cap test tube tube, virus collection tube, preservation Andrew Alliance Nagnet+ Add Add Add Andrew Alliance Nagnet+ Add Add Add Andrew Alliance Nagnet+ Add Add Add	Absorbance plate reader	10 mL flat-bottom	13x84mm collection	16x100mm		
Andrew Alliance Yaster- Shaker+ Andrew Alliance Petiter+ Andrew Alliance Shaker+ Andrew Alliance Shaker+	Andrew Alliance Andrew+	screw cap test tube	tube, virus preservation	collection tube, COPAN UTM®		
Andrew Allance Magnet* Andrew Allance Petier+ Andrew Allance Staker* Andrew Allance Vacuum+	Andrew Alliance Heater- Shaker+	(+) Add	(+) Add	(+) Add		
Andrew Allance Petter+ Andrew Allance Stakes+ Andrew Allance Vacuum+	Andrew Alliance Magnet+					
Andrew Aliance States+ Andrew Aliance Vacuum+	Andrew Alliance Peltier+					
Andrew Alliance Vacuum	Andrew Alliance Shaker+					
	Andrew Alliance Vacuum					

Add reagent at start をクリック

	STEPS	LABWARE INFO
	SOLUTION AT STA	IRT
	No solution	at start yet
ය 	Add reager	nt at start
	or	
Actions	Fill in with a sample re	ference Sample
	A sample will be n experime	ecorded at each ent run.
	· J Import soli	utions at start
Fisherbrand [™] Premium 1.5 mL microtube		

01 stock DNA を選択

lters	Frequently used reagen	5				
From the entire lab	+	٠			٠	
From current protocol	Create now reagent	Water 1 a.u.	L-SOHdC 5 ng/ml.	80HdG 1 a.u.	delonized water 1 a.u.	
		4 select	C4 Select	4 select	4 Select	
			۵	۵	•	٠
	01 stock DNA 1 a.u.	01 water 1 a.u.	01 Yellow Buffer 1 a.u.	SOHdC 10 mg/mL	50HdC 100 µg/mL	50НdС 1 а.ц.
	▲ Select	▲ Select	∆ Select	∆ Select	▲ select	A Select

```
STEPS
                                                                      LABWARE INFO
                                                                                 U. LABWARE
 -- New protocol #2 💠 V. 1 🔒 🕥 🗄 🕞 Execute
                                                                                    Target
Set labware as target of the experiment
                                                            SOLUTION AT START
 Ö
                                                                                     he end of the experiment, OneL
record the resulting samples

    01 stock DNA

 4
                                                                    50 µL
                                                                                        Fisherbrand<sup>™</sup> Premium 1.5
Ľ
                                                                                        mL microtube
                                                            Concentration 1 a.u.
                                                                                       Tubes & vials
0+
                                                                                       11926955
                                                                                  Part number
                                                                                       1.6 ml
                                                                Show reagent detail
                                                                                      Show product detail
                                                                Replace Delete
                                                                                       Replace labware
                                                                                 Comment
  LABWARE INFO の一番下 Comment に cooled と入力
                                                                                  cooled

 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
             から Replicate を選び、500pg/µL、50pg/µLの2本分を追加
(5)
                     から、01 500pg/µL、01 50pg/µL をそれぞれ選択
      1 solution
```

5. 4番の表のとおりに、各溶液を分注します。

Volume に入っている量(ここでは 50)を入力



01 stock DNA をクリックしたまま、 01 5000pg/μL ヘドラッグ 緑の矢印 が表示されます

Volume に分注したい量を入力

(1)

Save step をクリック

🗙 🧪 1. Pipetting			Scroll to navigate through all the parameters	Save step
Sources 01 stock DNA So pt.	Configuration	Configuration		
Destinations 01 5000pg/µl AUTO (20 µL)	Automation Guidelines	2.4 μL Multi-volume mode		
Edit selection				

② 01 water から 01 5000pg/µL へ必要量を分注

Mixing の Dstinations を

		 Change tip at the beginning 	
Sources	Configuration	Change tip between pipetting steps	
01 water 4 mL	Advanced	Use tips with filter	
	Automation		
Destinations	Guidelines	Mixing (i)	
01 5000pg/µl AUTO (22.4 µL)	Gutenres	Sources	Destinations
		Mixing	Mixing
Edit selection		- 3 times +	- 3 times +
		Speed	Speed
		Slow 🔘 Normal 🛑 Fast	Slow 💿 Normal 💿 Fast
		Volume	Volume
		of	47.6 ul

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、 ビ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 M	ix 60 個分	1個分
water	$378 \mu L$	6.3µL
\mathbf{Fw}	$36 \mu L$	0.6µL
$\mathbf{R}\mathbf{v}$	$36 \mu L$	0.6µL
SYBR Green	600µL	10µL
合計	$1050 \mu L$	$17.5 \mu L$

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、

最後にピペッティングするようプログラムする

(注意) 02 SYBR Green、02 Master Mix を使用する場合の設定をする時は、 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

Sources () Matter Me ALTO (1.435 ml)	Configuration Advanced Automation Guidelines	Advanced Pipeting Pipeting mode Onward Reverse Repetitive me Disave before biow-out Handling liquid viscosity Appration speed Onward Pipeting Pipet	vér ① Dispensing speed ④ Stow Normal Fact
X / 15. Pipetting		Art by constant (Low vecosity appraimage Art bottom costion (Low vecosity appraimat) Art bottom costion (Low vecosity appraimat) Orange top at the baginning Orange top at the baginning Orange to between therein some	Scroll to navigate through all the parameters
22 Matter Mit AUTO (1:205 mit) Destinations Memory ⁴⁴ Fox Openal 0.1 mit Sweet RC Sweet RC 2.5 pi Select webs Edit selection	Configuration Advanced Automation Guidelines	Charge to between pipeting skaps Use taps with filter Saurces Moting Searces Speed Show Normal Fack Volume	Destituations Mading - S times + Speed Silvw Normal Fust Volume 17.5 pt

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.	(])	2	3	4
5,000pg/µL	$2.5 \mu L$		_	_
500pg/μL		$2.5 \mu L$	_	_
50pg/μL			$2.5 \mu L$	
Unknown			_	$2.5 \mu L$
Master Mix	$17.5 \mu L$	$17.5 \mu L$	$17.5 \mu L$	$17.5 \mu L$
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



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. ▶ Execute 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 π^{DA2} $\epsilon \rho J \gamma \rho$
- 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] C マイクロプレート上部の温度

Hold	Step1	$95^{\circ}\mathrm{C}$	00:20	
PCR	Step1	$95^{\circ}\mathrm{C}$	00:05	
	Step2	60°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

 $[\cdots] > [Stendard Curve Setup]$

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	$\begin{bmatrix} 3 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} 2 \end{bmatrix} = 6$	
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 ウェルプレートをリアルタイム PCR 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 ウェルプレートをリアルタイム PCR から取り出す



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×2ⁿ



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×2ⁿ

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: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



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)







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)

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
- 【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
O. k				
Uq 旭				
半均				

)

2. 検量線はどんなグラフでしたか? 書き写してみましょう。

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

Unknown	
平均	
正解	

e = 10 e+3 = 10³ = 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。考察してみましょう。