

日本生物学オリンピック 2016 本選 つくば

予備体験



予備体験 1

マイクロピペット、電気泳動装置、ストップウォッチの使い方と実践

時間 45 分

注意事項

機器の使用法でわからない点があれば、スタッフに質問してください。

サンプルと器具類

□にチェック✓を入れながら確認して下さい。不足している場合は挙手により知らせて下さい。

サンプルと試薬

- ☐ 1.5 mL マイクロチューブ①（滅菌蒸留水、20 μ L） 1 本/1 人
- ☐ 1.5 mL マイクロチューブ②（アガロースゲル電気泳動用の青色の色素液、7 μ L）
1 本/1 人

器具

- ☐ マイクロピペット（P20） 1 本/1 人
- ☐ ピペットチップ（P20 用、黄色） 1 箱/2 人
- ☐ ストップウォッチ 1 個/2 人
- ☐ 電気泳動装置及びアガロースゲル 1 セット/2 人

机の上においてあるキムワイプ、キムタオル、洗ビン（蒸留水）は自由に使えます。
2つのプラスチックビーカーは廃棄物用に使ってください。1つはピペットチップなどの固体用、もうひとつは液体用です。

手元にある試薬を使い終わった場合は、挙手により知らせてください。

< マイクロピペットの使い方 >

マイクロピペット(図1)は微量の液体を測り取る時に用います。今回使用するマイクロピペット P20 では $2\ \mu\text{l}$ ~ $20\ \mu\text{l}$ の容量を測り取ることができ、目盛り調節ダイヤルを回して測り取る容量を設定します。プッシュボタンを上下させることにより本体内の空気を動かすことで液体を吸い上げたり排出したりできる構造になっています。

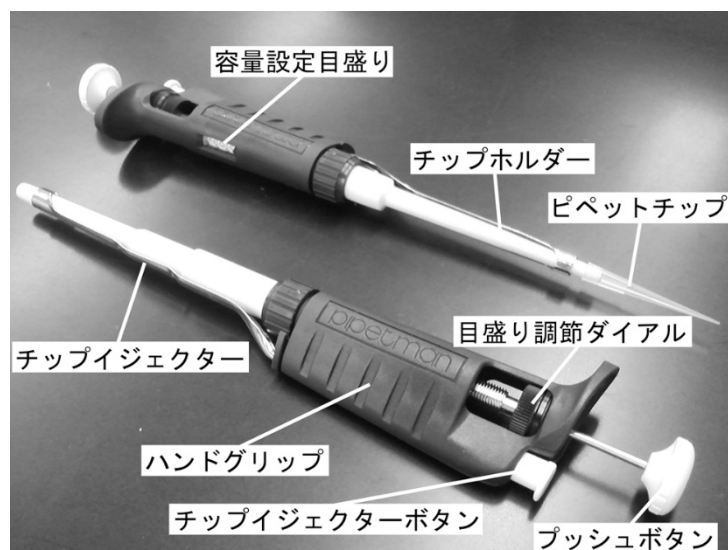


図1 マイクロピペット(ピペットチップ装着)

- 1) 目盛り調節ダイヤルを回して測り取る容量にセットする(図2参照)。ダイヤルはゆっくり回す必要はないので手早く設定容量にセットする。

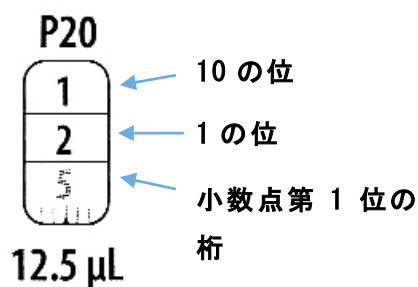


図2 マイクロピペットの容量
設定目盛り
(GILSON 社 PIPETMAN
取扱説明書より)

- 2) 親指でプッシュボタンを押せるように片手でハンドグリップを握る。チップイジェクターボタンが手のひら側の向きになるように握る。
- 3) ピペットチップが入った箱(チップラック、図3)のふたを開け、ピペットチップにチップホルダーの先端を差し込んで装着する。P20 は黄色のピペットチップを使用する。ピペットチップとチップホルダーの間から空気が漏れないように、装着したピペットチップでチップラックを軽くトントンと叩くようにしてしっかりと装着する。装着後チップラックのふたを閉める。

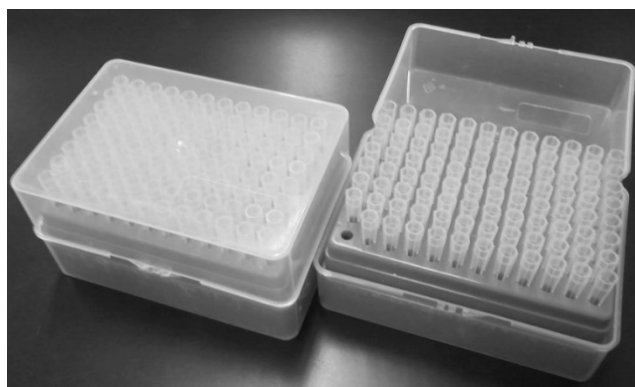


図3 チップラック

- 4) プッシュボタンを第一ストップ(図4)まで押し込み、その状態のままピペットチップの先端を液につけ、ゆっくりかつ滑らかにプッシュボタンをトップまで戻すことで液を吸い上げる。

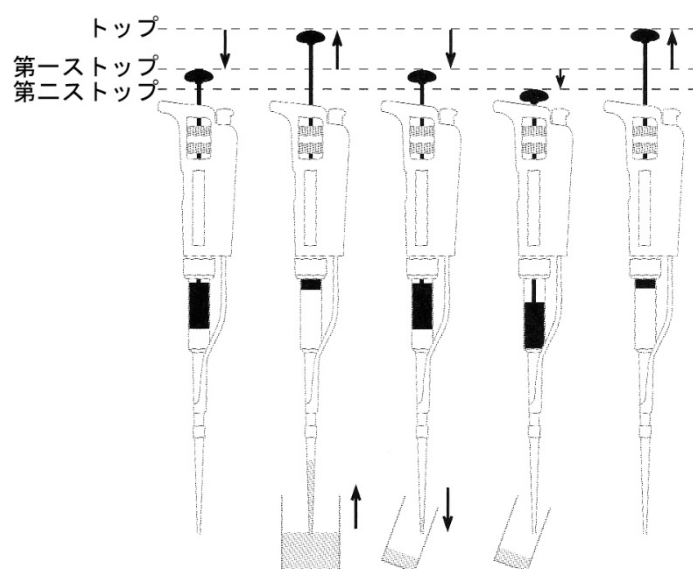


図4 プッシュボタンの動かし方

(GILSON 社 PIPETMAN 取扱説明書より)

- 5) ピペットチップの先端を、液を移す容器に入れ、プッシュボタンをゆっくりと第一ストップまで押し下げて液を排出する。第一ストップで一度止めたプッシュボタンを続けて第二ストップまで強く押し下げ、ピペットチップ内に残った液を完全に排出する。
- 6) プッシュボタンをトップまでゆっくりと戻す。
- 7) イジェクターボタンを親指で押してピペットチップを取り外す。ピペットチップは測りとり液体が変わるたびに使い捨てる。

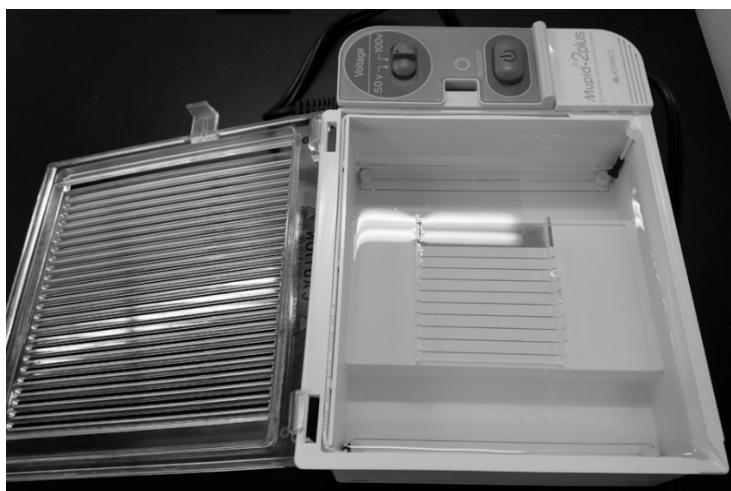
注意点)

- ・ 必ずピペットチップを装着して液を吸い上げること。
- ・ 液を吸い上げた状態でマイクロピペットを逆さまにしないこと。
- ・ 液を吸い上げる際に、マイクロピペット本体まで液を吸い込まないように注意してゆっくり操作すること。特に吸い上げ途中でプッシュボタンから指を離すことは絶対にしないこと。ただし、

ゆっくり動かしすぎてシリンダーの移動がスムーズでない場合は測り取る量の正確性が損なわれるので、滑らかに動かすよう注意する。吸い上げ開始から完了まで 1～2 秒かけるのが適正な速度である。また、マイクロピペット作業中に本体まで液を吸い込んでしまった場合は速やかに挙手し、アシスタントに知らせること。

< 電気泳動装置の使い方 >

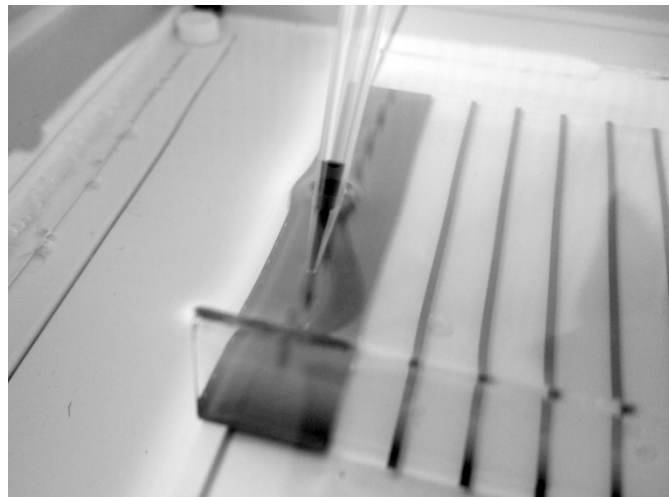
- 1) 泳動槽の中央にプラスチックトレイ付のゲルがあり、浮き上がっていないことを確認する。



DNA は泳動槽に通電すると陽極側に移動するため、ゲルのウェル(穴)が陰極側になる方向で使用する(プラスチック製のカバーにプラスとマイナスで表記されている)。

- 2) ピペットチップを装着したマイクロピペット P-20 でマイクロチューブ②の色素液を 5 μ L をとり、マイクロチューブ①の滅菌蒸留水 (20 μ L) に加える。ピペットチップの先でよく混ぜる。

- 3) 青い色素を混ぜた滅菌蒸留水 20 μL をピペットチップ P-20 で分取し、そのままアガロースゲルのウェルに静かに入れる。比重が重いため、サンプル溶液はウェルの底に沈む。



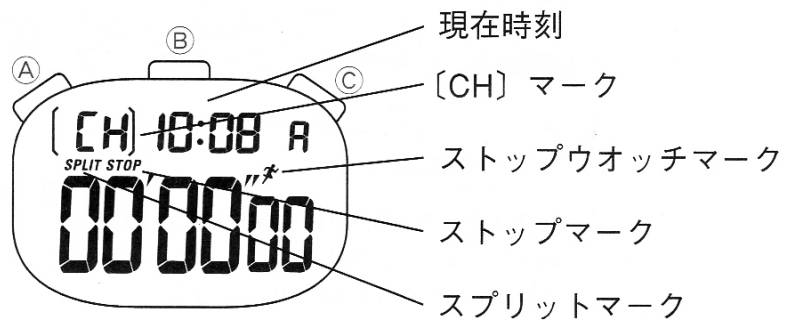
- 4) プラスチック製のカバーをして、100V の電圧設定であることを確認したらスイッチを入れ泳動を開始する。

注意点)

- ・ 通電中は泳動槽に指などを入れないこと(感電注意)。
- ・ 泳動しようとするサンプル溶液をウェルに入れる際、ウェルの底をピペットチップの先端で破らないように注意すること。
- ・ プラスチックトレイからゲルが外れても泳動槽の中央にゲルがあれば泳動可能であるため、注意深く位置を戻すこと。
- ・ ゲルが動かないように泳動中は泳動槽を動かさないこと。
- ・ 泳動時の電圧設定に注意すること(今回は 100V 設定)。

< ストップウォッチの使い方 >

1) ボタンBを何度か押して画面左上の表示を「CH」にする。



2) ボタンAを押して表示を「00'00"00」にリセットする。

3) ボタンCを押して計測を開始する。ストップウォッチマークが点滅し、デジタル表示の加算がスタートする。

4) ボタンCを再度押して計測を終了する。ストップマークが点灯し、デジタル表示の加算がストップする。

5) 再度使用する場合はボタンAを何度か押して表示を「00'00"00」にリセットする。

注意点)

- 計測中に間違えてボタンAを押してもデジタル表示はストップする。その際にはストップウォッチマークとスプリットマークが両方とも点滅している。計測を終了したい場合はその数値を計測時間とする。誤って計測中にボタンAを押してしまった場合は、もう一度ボタンAを押すことで復帰できる。戻るまでの時間も計測は継続されている。

日本生物学オリンピック 2016 本選 つくば

予備体験



予備体験 2
正立顕微鏡の使い方

時間 45 分

注意事項

顕微鏡の使用法で分からない点があれば、スタッフに質問してください。

観察しているサンプルの詳細情報等に関しては、スタッフは答えることができません。

サンプルと器具類

□にチェック✓を入れながら確認して下さい。不足している場合は挙手により知らせて下さい。

サンプルと試薬

- 15 mL プラスチックチューブ (トランスファーピペットが挿してあります)
1本/1人

器具

- 正立顕微鏡
- スライドガラス 1箱/2人
- カバーガラス 1箱/2人

机の上においてあるキムワイプ、キムタオル、洗ビン（蒸留水）は自由に使えます。
2つのプラスチックビーカーは廃棄物用に使ってください。1つはピペットチップなどの固体用、もうひとつは液体用です。

手元にある試薬を使い終わった場合は、挙手により知らせてください。

正立顕微鏡使用マニュアル

顕微鏡の初期設定（図 1 参照）

1. 光源スイッチを ON にする。光量調節ツマミを回して適度な明るさに合わせる。
2. 粗動ハンドルを回してステージを一番下まで下げる。
3. レボルバーを回して対物レンズを 4 倍（最低倍率）にする。

プレパラートの作製法（各工程はあくまで一般的な方法であるため、試料の性質を理解して適宜工夫をすること）

4. 机上有る試料をピペットで 1 滴とって、スライドガラスの中央部に載せる。
5. その上にカバーガラスを載せて周囲からもれでた試料の液をキムワイプで吸い取る。

標本のセット（図 2 参照）

6. 標本押さえにプレパラートをセットして標本押さえレバーで固定する。
7. コンデンサー上部のレンズから見えている照明光の位置に、標本の観察したい部位を、ステージ移動ハンドルを使って移動させる。

ピント合わせ

8. 対物レンズを横から見ながら粗動ハンドルをまわしてステージを上げ、レンズとカバーガラスの距離をできるだけ近づける。この時、対物レンズと試料とが誤ってぶつかることを避ける必要があるため、接眼レンズをのぞきながら作業してはいけない。
9. 接眼レンズをのぞきながら、ピントが合う位置まで粗動ハンドルをステージが下がる方向にゆっくりと回転させる。この時、ステージを上げる方向に回してはいけない。
10. 微動ハンドルを回してピントを微調整する。

***初めて使う顕微鏡では、ここで下記の眼幅、視度調整を行う。**

11. コンデンサー絞子を使ってコントラスト、焦点深度を調整する。
12. 倍率を上げて観察する場合には、レボルバーをまわして対物レンズを 10 倍、40 倍に交換する（今回は 100 倍の対物レンズは使用禁止です）。

眼幅、視度調整（上記の 6,7 を右目で行うこと）

眼幅、視度などは個人ごとに違いがあるので顕微鏡には各人の違いを補正する機能がある。

眼幅調整：接眼レンズを左右に動かして自分の眼の幅にあった状態で観察する。左右の丸い視野像が一個になった位置が正常な位置になる。

視度調整：左右の眼のピントが違うので、先ず右目で観察する標本にステージを上下してピントを合わせる。ステージをそのままの状態にして左目で覗き接眼レンズの根本にある視度補正環を回転させピントを合わせる。

※コンデンサーの使い方

- ・コンデンサーには絞りがついており、絞りを開閉することにより標本にコントラストをつけたり焦点深度を調整することができる（以下の表を参照のこと）。

	コンデンサー絞り（開）	コンデンサー絞り（閉）
明るさ	大	小
焦点深度	浅	深
コントラスト	弱	強

注：使用中、レンズがよごれた場合には監督員(TA)まで申し出てください。

図1 正立顕微鏡全体図

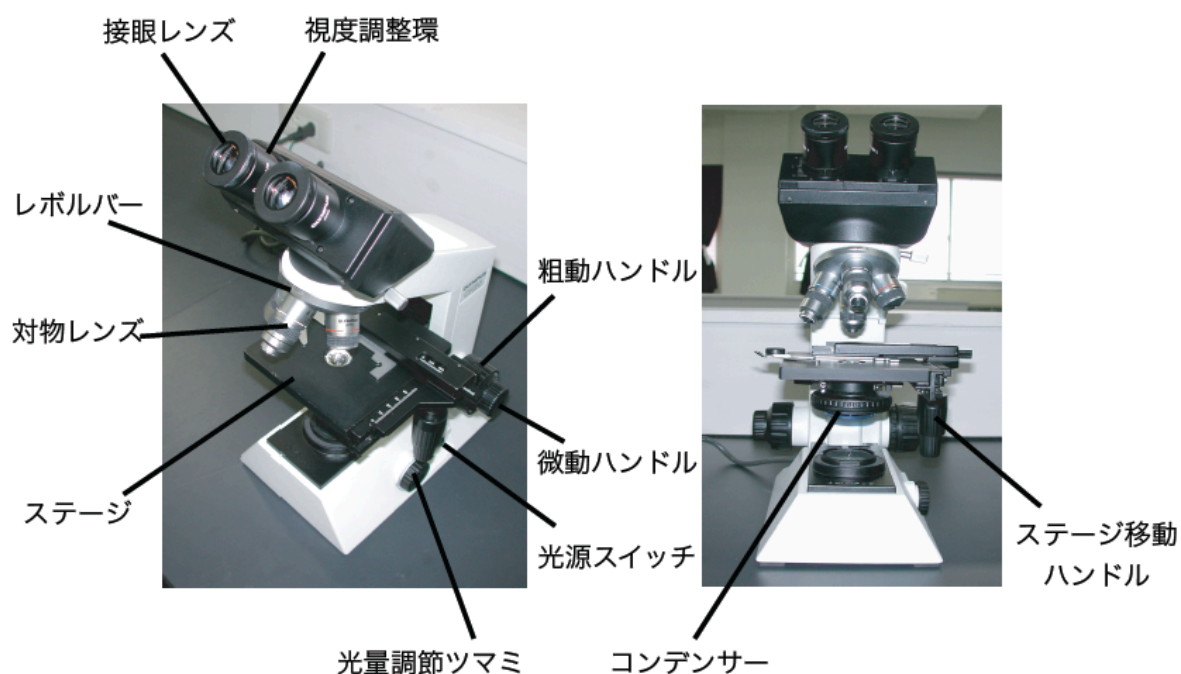
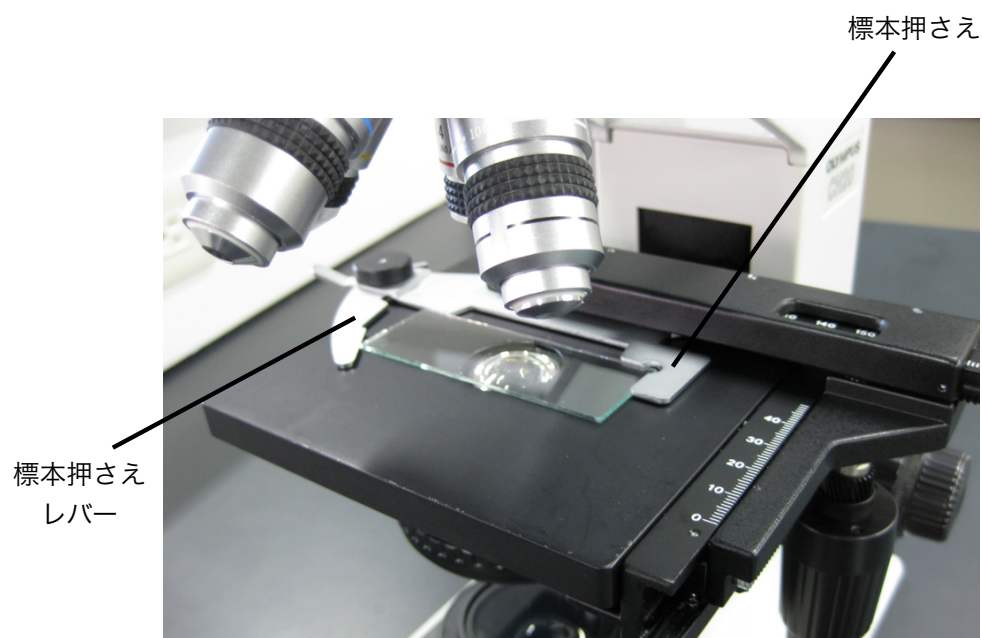


図2 ステージへの標本のセット



日本生物学オリンピック 2016 本選 つくば

予備体験



予備体験 3

マイクロピペット、小型遠心機、実体顕微鏡、カウンタの使い方と実践

時間 60 分

注意事項

機器の使用法でわからない点があれば、スタッフに質問してください。

サンプルと器具類

☐にチェック✓を入れながら確認して下さい。不足している場合は挙手により知らせて下さい。

サンプルと試薬

- ☐マイクロピペット操作練習用の蒸留水（「水」とラベル）（10 mL） 1本/1人
- ☐線虫 *Caenorhabditis elegans*（以下「シーエレガンス」）を飼育した 50 mm 寒天培地 1枚/1人
- ☐シーエレガンスを飼育していない空の 50 mm 寒天プレート 1枚/1人
- ☐M9 緩衝液（5 mL） 1本/1人

器具

- ☐マイクロピペット（P1000） 1本/1人
- ☐マイクロピペット（P200） 1本/1人
- ☐マイクロピペット（P20） 1本/1人
- ☐ピペットチップ（P1000 用、白色） 1箱/2人
- ☐ピペットチップ（P20 用、黄色） 1箱/2人
- ☐1.5 mL マイクロチューブ 2本/1人（予備1本を含む）
- ☐卓上小型遠心機 1台/1人
- ☐遠心バランス 500 μ L 1本/1人
- ☐遠心バランス 1 mL 1本/1人
- ☐マイクロチューブ立て（青色） 1個/1人
- ☐実体顕微鏡 1台/1人
- ☐手動式カウンタ 1個/1人
- ☐ストップウォッチ 1個/1人

机の上においてあるキムワイプ、キムタオルは自由に使えます。

2つのプラスチックビーカーは廃棄物用に使ってください。1つはピペットチップなどの固体用、もうひとつは液体用です。

手元にある試薬を使いきった場合は、挙手により知らせてください。

マイクロピペットの使い方

マイクロピペット(図1)は 1.0 mL (= 1000 μ L) 以下の微量の液体を測り取る時に用います。今回使用するマイクロピペット P1000、P200、P20(プッシュボタンに書かれています)では、それぞれ 200 μ L~1000 μ L、50 μ L~200 μ L、2 μ L~20 μ L の容量を測り取ることができ、目盛り調節ダイヤルを回して測り取る容量を設定します。プッシュボタンを上下させることにより本体内の空気を動かすことで液体を吸い上げたり排出したりできる構造になっています。

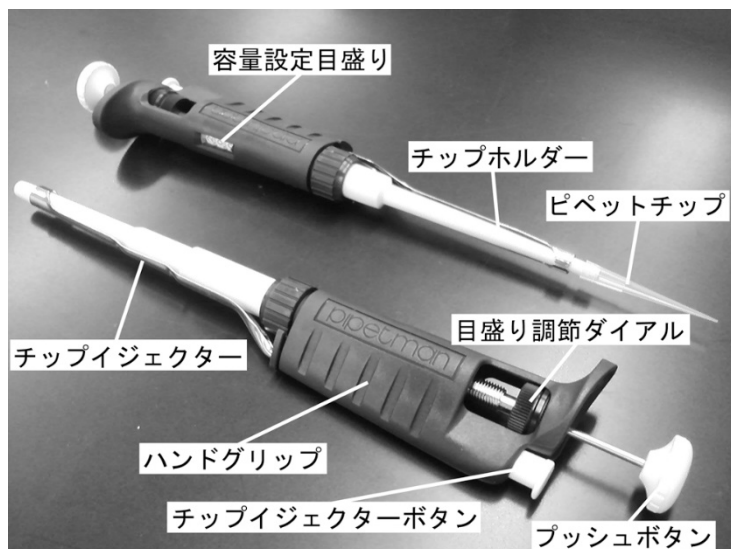


図1 マイクロピペット(手前: P1000、奥: P200 ピペットチップ装着)

使い方の練習にあたり、手元に配られたマイクロピペット操作練習用の蒸留水を自由に使うことができます。

- 1) 目盛り調節ダイヤルを回して測り取る容量にセットする(図2参照)。ダイヤルはゆっくり回す必要はないので手早く設定容量にセットする。

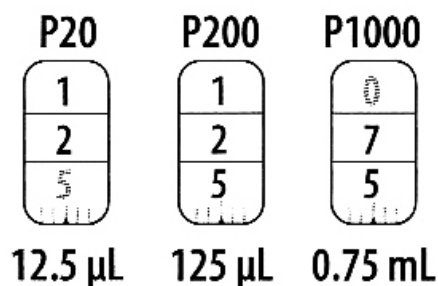


図2 マイクロピペットの容量設定目盛り

(GILSON 社 PIPETMAN 取扱説明書より)

- 2) 親指でプッシュボタンを押せるように片手でハンドグリップを握る。チップイジェクターボタンが手のひら側の向きになるように握る。
- 3) ピペットチップが入った箱(チップラック、図3)のふたを開け、ピペットチップにチップホルダーの先端を差し込んで装着する。P1000は白色、P200とP20は黄色のピペットチップを使用する。ピペットチップとチップホルダーの間から空気が漏れないように、装着したピペットチップ

プでチップラックを軽くトントンと叩くようにしてしっかりと装着する。装着後チップラックのふたを閉める。

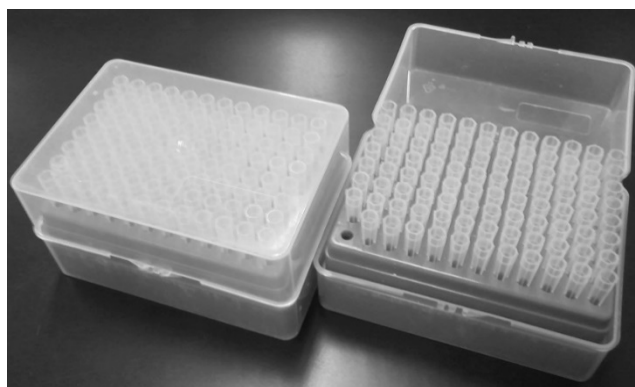


図3 チップラック

- 4) プッシュボタンを第一ストップ(図4)まで押し込み、その状態のままピペットチップの先端を液につけ、ゆっくりかつ滑らかにプッシュボタンをトップまで戻すことで液を吸い上げる。

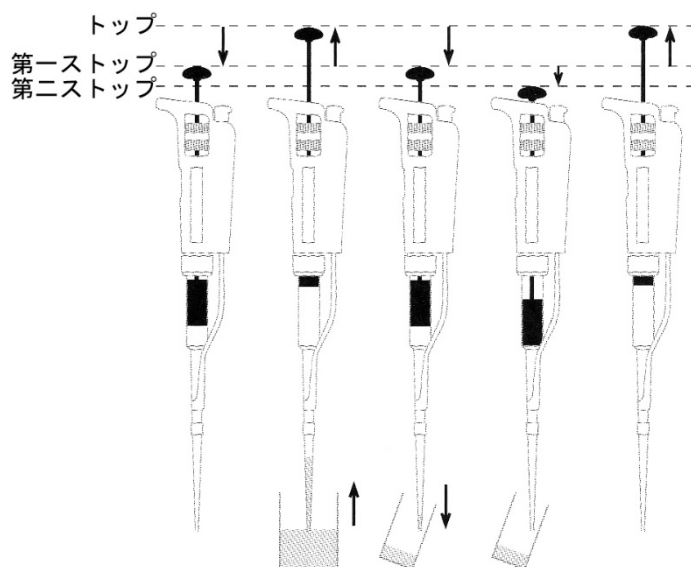


図4 プッシュボタンの動かし方

(GILSON 社 PIPETMAN 取扱説明書より)

- 5) ピペットチップの先端を液を移す容器に入れ、プッシュボタンをゆっくりと第一ストップまで押し下げて液を排出する。第一ストップで一度止めたプッシュボタンを続けて第二ストップまで強く押し下げ、ピペットチップ内に残った液を完全に排出する。
- 6) プッシュボタンをトップまでゆっくりと戻す。
- 7) イジェクターボタンを親指で押してピペットチップを取り外す。ピペットチップは測りとり液体が変わるたびに使い捨てる。

注意点)

- ・ 必ずピペットチップを装着して液を吸い上げること。
- ・ 液を吸い上げた状態でマイクロピペットを逆さまにしないこと。

- ・ 液を吸い上げる際に、マイクロピペット本体まで液を吸い込まないように注意してゆっくり操作すること。特に吸い上げ途中でプッシュボタンから指を離すことは絶対にしないこと。ただし、ゆっくり動かしすぎてシリンダーの移動がスムーズでない場合は測り取る量の正確性が損なわれるので、滑らかに動かすよう注意する。吸い上げ開始から完了まで 1～2 秒かけるのが適正な速度である。また、マイクロピペット作業中に本体まで液を吸い込んでしまった場合は速やかに挙手し、アシスタントに知らせること。

小型遠心機を用いたシーエレガンスの回収の方法

本実験では、線虫（シーエレガンス）を飼育プレートから回収する作業が必要となります。その基本的な手順を予備体験しておきます。

- i) シーエレガンスがいる 50 mm 寒天プレートの上に、P1000 チップを着けたマイクロピペットを用いて、M9 緩衝液 1 mL を入れる。その後、M9 緩衝液が寒天全体に行き渡るように寒天プレートを少しゆする。この際、液体が寒天プレートの外にこぼれないように注意すること。
- ii) P1000 チップをマイクロピペットに装着し、寒天に入れた M9 緩衝液を吸い、寒天に吹き付ける作業（ピペッティング）を行う。ピペッティングを 5～10 回繰り返すことで、シーエレガンスを M9 緩衝液中に浮き上がらせる。
- iii) P1000 チップを着けたマイクロピペットを用いて、シーエレガンスを含む M9 緩衝液 500 μ L を寒天プレートから回収して、新しいマイクロチューブに入れる。
- iv) 小型遠心機でシーエレガンスの入ったマイクロチューブを 30 秒間遠心する。この際、配布した「遠心バランス 500 μ L」を、遠心機の回転軸を中心として対角線上になるようにセットして、遠心機の重心バランスを取る。遠心機のスイッチは右側にある。

注意点）安全のため、回転中はふたを開けないこと。
- v) 小型遠心機からシーエレガンスの入ったマイクロチューブを取り出し、チューブ底に落ちたシーエレガンスを吸わないように注意しながら、上清 450 μ L を抜く。
- vi) シーエレガンスの入ったマイクロチューブに、新しい M9 緩衝液 950 μ L を加えてフタを閉じ、チューブを何回か反転させる。
- vii) 再び、小型遠心機でシーエレガンスの入ったマイクロチューブを 30 秒間遠心する。この際、配布した「遠心バランス 1 mL」を用いて遠心機の重心バランスを取る。
- viii) 小型遠心機からシーエレガンスの入ったマイクロチューブを取り出し、上清 950 μ L を抜く。以上の工程により、体壁についた余計なエサやゴミを取り除く。この段階で、シーエレガンスを含む M9 緩衝液約 50 μ L がマイクロチューブに残っているはずである。
- ix) マイクロチューブの底を指で弾いて（タッピング）、シーエレガンスを M9 緩衝液中に攪拌させる。
- x) 配布した空の 50 mm 寒天プレートの中央付近に、洗浄済みシーエレガンスの入った M9 緩衝液を 5 μ L 摘下する。この際、チップの先で寒天を深く傷つけないように注意を払うこと。マイクロピペットの先端が震えさせないようにするために、昨日の電気泳動でのサンプルローディングと同様に、マイクロピペットを持たない手をマイクロピペットに添えると良い。
- xi) 実体顕微鏡を用いて、寒天上にシーエレガンスがいるかを確認する。

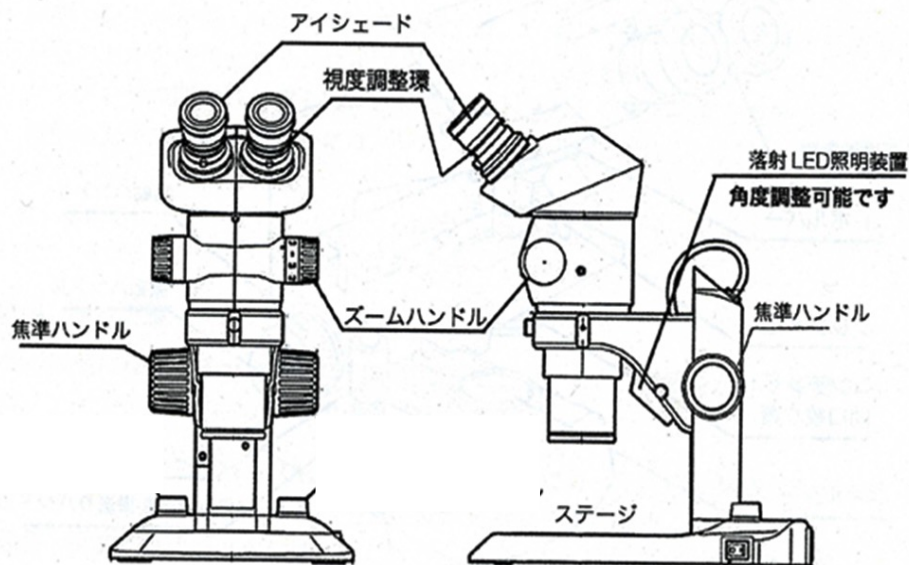
実体顕微鏡の使い方

観察する際の操作

- i) 光源スイッチを ON にする。光量調節ツマミを回して適度な明るさに合わせる。
- ii) 角度を調整して、試料に光が十分当たるようにする。
- iii) 焦準ハンドルとズームハンドルを回して、ピントと倍率を調整する。

眼幅、視度などは個人ごとに違いがあるので、実体顕微鏡には各人の違いを補正する機能があります（昨日に用いた正立顕微鏡と同様です）。

1. 眼幅調整：接眼レンズを左右に動かして自分の眼の幅にあった状態で観察する。左右の丸い視野像が一個になった位置が正常な位置になる。
2. 視度調整：左右の眼のピントが違うので、先ず右目で観察する標本にステージを上下してピントを合わせる。ステージをそのままの状態にして左目で覗き接眼レンズの根本にある視度調整環を回転させピントを合わせる。



カウンタの使用の注意

カウント数をゼロに戻したい場合には、カウンタ側面にあるツマミを回転させることで、ゼロに戻すことができる。

日本生物学オリンピック 2016 本選 つくば

予備体験



予備体験 4

細菌の固定・染色・観察の実践

時間 60 分

注意事項

機器の使用法でわからない点があれば、スタッフに質問してください。

サンプルと器具類

□にチェック✓を入れながら確認して下さい。不足している場合は挙手により知らせて下さい。

サンプルと試薬

- ☐ マイクロチューブ（ヨーグルト懸濁液入り） 1本/1人
- ☐ 細菌染色液 A 1本/1人
- ☐ 細菌染色液 B 1本/1人
- ☐ 脱色液 1本/1人
- ☐ 洗びん（蒸留水） 1本/1人
- ☐ マイクロチューブ（油浸液入り） 1本/1人

器具

- ☐ 正立顕微鏡 1台/1人
- ☐ スライドガラス 1箱/2人
- ☐ カバーガラス 1箱/2人
- ☐ スライドガラス台 1個/1人
- ☐ スポイト 3本/1人
- ☐ ガスライター 1本/1人
- ☐ マイクロピペット（P20）/1人
- ☐ ピペットチップ（P20用、黄色）1箱/2人

机の上においてあるキムワイプ、キムタオルは自由に使えます。

2つのプラスチックビーカーは廃棄物用に使ってください。1つはピペットチップなどの固体用、もうひとつは液体用です。

手元にある試薬を使いきった場合は、挙手により知らせてください。

細菌の固定

- ① 前日の予備体験を参考にして、マイクロピペット（P20）を用いてマイクロチューブ（ヨーグルト懸濁液入り）から、ヨーグルト懸濁液 10 μL をとり、スライドガラス上にのせる。
- ② スライドガラスをスライドガラス台にのせる。ガスライターを使ってスライドガラスの下を軽く炎であぶり、ヨーグルト懸濁液の水分を蒸発させる。

注意：炎であぶった直後は、スライドガラス、スライドガラス台が熱くなっている可能性があるので取り扱いに注意してください。

細菌の染色

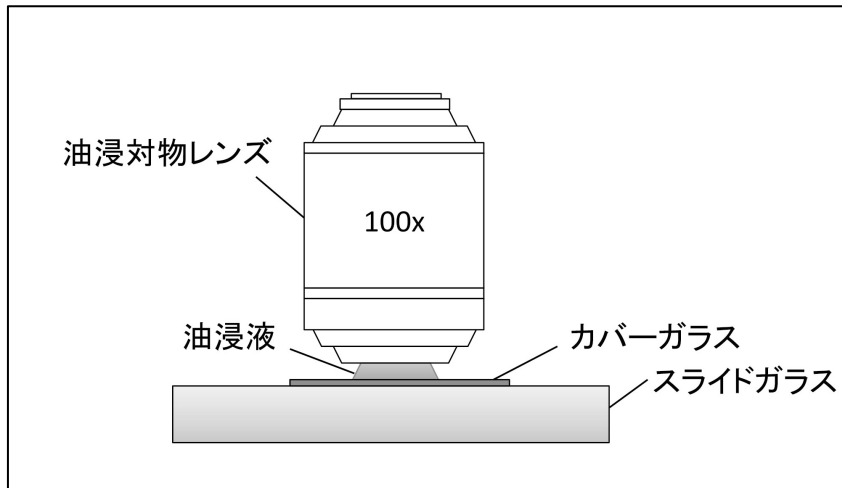
- ③ 水分が蒸発した箇所に細菌染色液 A をスポイトで 1 滴たらし、約 1 分待つ。
- ④ プラスチックビーカーの上で洗びん（蒸留水）を使い、細菌染色液 A を洗い流す。
- ⑤ 細菌染色液 A の青色が溶け出さなくなるまで、スポイトで脱色液を加える。
- ⑥ プラスチックビーカーの上で洗びん（蒸留水）を使い、脱色液を洗い流す。
- ⑦ 細菌染色液 B をスポイトで 1 滴たらし、約 1 分待つ。
- ⑧ プラスチックビーカーの上で洗びん（蒸留水）を使い、細菌染色液 B を洗い流す。

前日の予備体験を参考にして、プレパラートを作成する。

細菌の観察

正立顕微鏡の基本的な使い方は前日の予備体験を参考にしてください。ここでは、油浸対物レンズの使い方を説明します。

細菌は非常に小さいので、正立顕微鏡を用いた観察では 100 倍の油浸対物レンズを使用します。油浸対物レンズを用いた観察では、下図のように、カバーガラスと対物レンズの間に極少量の油浸液の層をつくります。



- ① 10～40 倍の対物レンズを用いて観察し、最終的に 40 倍の対物レンズを用いて観察した時に、対象（細菌が染色されている場所）のピントが合っている状態にする。
- ② レボルバーを回して、対物レンズとプレパラートの間に空間をつくる。
- ③ マイクロチューブ(油浸液入り)からマイクロピペットを用いて油浸液 3 μL をとり、カバーガラス上面の光路の中心にのせる。
- ④ 対物レンズを 100 倍に変える。このとき、対物レンズとカバーガラスの間が、油浸液の層で満たされていることを確認する。
- ⑤ 微動ハンドルを回し、ピントを合わせる。