

[フローサイトメーターの説明]
2022年3月4日 (金)

植物サンプルの調整 (カワレダイコン)

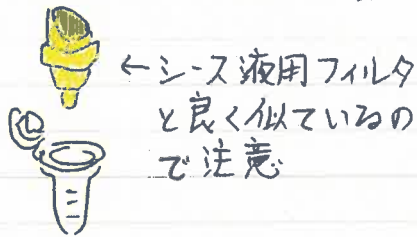
(1) サンプル(葉)のチョッピングは市販のカミソリが良い。
(ステンレスよりカーボン製)

(2) 葉をプラスチックシャーレの上で 1 cm^2 程度に切る。

(3) サンプルに $400\mu\text{L}$ の核抽出液を加えてチョッピング(切りきざむ)。

(4) 1.5 mL エッペンドルフを用意

(5) 抽出液を $50\mu\text{m}\phi$ のメソグレンフィルターを必ず通す。



(6) 核染色液を $1600\mu\text{L}$ 加える
(マイクロピペット $800\mu\text{L} \times 2$ 回)

植物サンプルのゲノム量分析

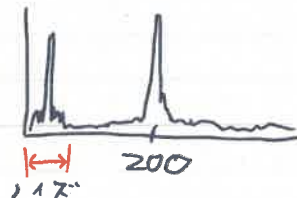
(7) シース液の流速は 0.5 mL/Sec

(8) スタート (▶) で分析開始

(9) スペースキーでデータリフレッシュ
(開始 45 秒くらいは安定しない)

(10) 電圧のゲインセッティングでピークの幅を 200 を中央に合わせせる。

(11) 域値 (スレッショールド) を調整し、グラフ左のノイズをカットする



(12) DI (DNAインデックス) は 2 倍体をスクロールバーで 1 に合わせる。

植物サンプルの交換

(13) クリーニングボタン (■) でフローセル (センサー) だけ洗う。

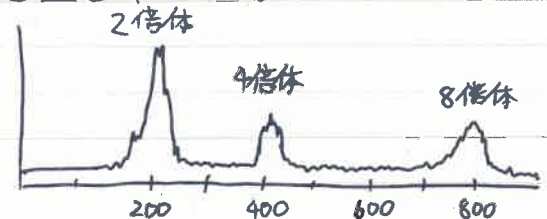
(14) 次のサンプルチューブに交換する。

↓
分析 サンプルノイズなど

(15) 分析が終了したら流路をクリーニングソリューションの入ったチューブに取り替えて洗浄する。

MEMO

・カワレダイコンは核内倍加が発生しやすい。



核内倍加はカワレダイコン (ダイコンの発芽時) の様に極めて成育速度が速いときに起る現象である。

↓
細胞分裂よりも効率的にタンパク質を増加 (成長) させるしくみではないかと考えられている。

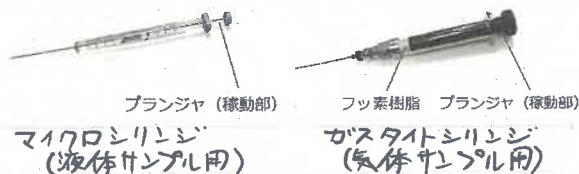
・ノジギク成葉ではピークは一つのみ (4 倍体)。

・ピーク検出はチョッピング操作を念に行うことがポイントとなる様だ。

[ガスクロマトグラフ 操作手順]

- ① パソコン ON → 本体 ON
- ② パソコン画面右下のアイコンが緑になったら Labo solution (分析ソフト) を起動する。
- ③ 分析条件設定ファイル (メソッドファイル) を開く。
- ④ 画面左のアシスタントバー (縦並び) にある GC を起動する
- ⑤ SPL (スプリット) は気化器(室)の意味
- ⑥ Air は 点火時は100に画面で設定
分析時は400に設定
- ⑦ 安定時間は半日 (ベースラインで判断) が望ましい。
- ⑧ サンプル注入は流路に圧力がかかっているのでシリンジのプランジャ(ピストン)が飛び出すため、人差し指で押さえておく。 → サンプル注入
- ⑨ ベースラインに出るノイズのピークに対して約3倍の高さが 検出限界 となる。これを SN3 と言う
- ⑩ 液体サンプルの場合 SPL (気化室) の温度を 約 250℃ に上げる。
- ⑪ キャリアガスのヘリウムは 線速度が 30 ~ 40 cm / Sec が良いとされる
- ⑫ 設定で カラム情報が 取付けたカラムと合っていないと計算がおかしくなるので注意
- ⑬ スプリット比 = 注入したサンプルの何分の1が検出器に流れるかの比率
* 注入量を1とする。

- ⑭ サンプル注入には マイクロシリンジ (液体) か ガスタイトシリンジ (気体) を用いる。



- ⑮ パージ流量は 通常 3ml / Sec (パージガスの流量)
- ⑯ 条件設定は メソッドファイルに保存される。(新規作成すると標準値があらかじめ入力される)
- ⑰ カラムの設定温度よりも FID 検出器の設定温度は 20℃ ほど高く設定する。
→ FID を汚さないため
- ⑱ 停止操作
 - (1) 冷却用のファイル (Cool) を開き、ダウンロードボタンをクリック
↓
Cool 設定が GC 本体へ転送される
 - (2) FID と気化室 (SPL) の温度が 200℃ 以下 になるのを待つ。
- ⑲ パソコンのシャットダウン
↓
GC 本体の電源を OFF
↓
ガスの元栓を閉める (全部)
↓
コンプレッサーのコンセントを抜く
↓
コンプレッサ 本体下のドレン開放

[ガスクロマトグラフ] キャピラリーカラムの使用法]

① MICROPACKED-ST

・ガス分析用 (エチレン など)

・半キャピラリーカラム (充てん剤有り)

・ガス分析に向けたカラム

↓
分子量 が小さいもの

・CO₂ の変化も分析できる

・内径 1 mm - 2 mm 長



一般的ではないタイプ

・検出できない場合はカラムタイプの設定の問題である可能性

↓
設定② 内径 0.5 mm
カラム長 250 m
膜厚 10 μm
で登録する

* 検出感度が上がる

↓
現在のソフトウェアバージョンでは改善されている可能性

・水分 (H₂O) は流さない

↑
分析ピークが汚れる



② SH-I-5 ^{シル} MS

・液体サンプル用で汎用性高い

・キャピラリーカラム

・液体サンプルを気化させて分析

↓
有機溶媒 (液体) を使う

・水 (H₂O) は流さない (①同様)

↑
分析ピークがくずれる
バックフラッシュが発生する
(水蒸気圧でサンプルが逆流)

・キャピラリー内部が親水性コーティングされている。

・①よりも分析が難しい
→ 有機溶媒には様々な物質が溶け込むため

・もしカラムが折れる様な事が有れば プレスタイトコネクタで継ぐ。

・気体サンプルを流さない

↓
キャピラリー内部を傷める。

・取外したカラム内に空気が入らない様に保存時も両端をキャップしておく。

・分析対象 (例)

- ・農薬 (有機リン系)
- ・ネギ等の成分 (硫化アリル)
- ・バラ等の香り成分

↓
有機溶媒に溶かして分析

[水産廃棄物の農業利用研究]

2022年 7月2日 (土)

香住高校から送ってもらったサンプル

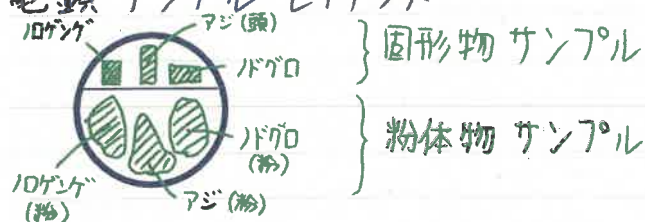


ノロゲンゲ



ノドグロ (小)

電頭 サンプル レイアウト



EDX 元素分析 (窒素 質量濃度 %)

ノロゲンゲ (固形) ~~23.1%~~

Nをうまく分析できていない

分析② 土壌分析 (~~RQ7L7ス~~)

① 試薬: ネスラー 試薬 原液

② 試薬: ① 25ml 調整 (4滴)

(1) 2% エリフゲン酸 0.5g

(2) HCl 3.5g (3.78 mol) (37%)

③ 10ml 調整 (2滴)

(1) 5% 塩化スズ 0.5g

(2) HCl 0.44g (1.2 mol) (37%)

④ 試薬: 10ml 調整 (2滴)

5% テトラフェニル 0.5g

分析① 平板培地の調整

(1) YG 培地

(2) YG + カツオ

(3) YG + こんぶ

(4) YG + いりこ

(5) YG + しいたけ

(6) YG + アジ

(7) YG + ノロゲンゲ

(8) YG + ノドグロ

D.W.の代りに100ml

乾燥サンプル 10g を 1l の温湯で抽出する。



20ml を プラゲトレ (5cm) のセル 1つ分に添加する。
(プラゲトレには圃場の土)



数日間 培養 (常温)

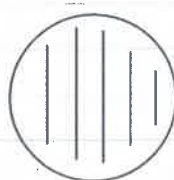


分析① 土壌菌類の変化

→ シャーレ YG 培地に 1 白金身

分析② 処理土壌の N・P・K 収支

→ 土壌分析で判断



土壌抽出液を線状に塗抹して JO 菌発生数を計測する
(JO 菌 / cm で判定)

[簡易土壌診断法をLabで数値化する]
2022年7月9日 (土)

土壌診断法(迅速養分テスト法)の発色をカラーチャートで判断するとあいまいな為、色を数値化できないか。
→スマホアプリを使ったL,a,b色空間を計測する事で可能ではないか。

P₂O₅ (リン酸) 青系発色 b(-60~-30)
明るさ L(0~100)

	L	a	b
0ppm	55.5	1.0	27.1
5ppm	52.8	-4.0	23.8
10ppm	47.9	-4.4	22.3
20ppm	47.7	-8.5	9.5
30ppm	43.5	-10.6	1.5
40ppm	38.9	-13.0	-2.8
50ppm	38.4	-12.8	-8.6

NO₃-N (硝酸態) 赤系発色 a(60~30)
明るさ L(0~100)

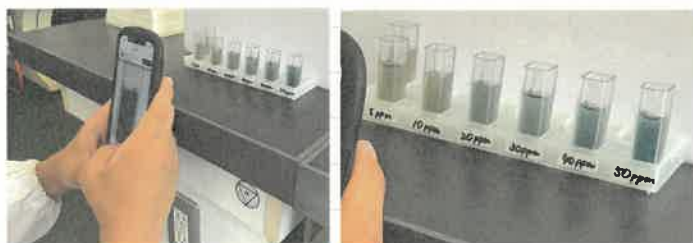
	L	a	b
0ppm	59.7	0.9	2.1
5ppm	66.3	8.9	-0.8
10ppm	55.7	17.2	-2.4
20ppm	48.7	34.8	-4.9
30ppm	47.8	42.8	-6.2
40ppm	43.9	50.1	-5.3
50ppm	44.8	54.9	-2.5

NH₄-N (アンモニア態) 黄系発色 b(60~30)

	L	a	b
0ppm	58.0	-1.3	2.5
5ppm	59.0	-1.6	12.5
10ppm	55.5	-2.2	21.3
20ppm	54.9	0.5	40.6
30ppm	50.6	2.8	45.2
40ppm	49.5	7.9	50.5
50ppm	52.8	17.3	59.3

K₂O (カリ) 灰系発色 L(0~100)

	L	a	b
0ppm	45.1	-1.36	2.6
10ppm	51.0	-2.29	-0.8
25ppm	71.2	-0.63	-2.5
50ppm	72.3	-0.86	-0.8
100ppm	84.1	-0.36	0.9
150ppm	86.7	-0.03	3.3
200ppm	89.2	-0.03	3.2



NO₃-N (硝酸態) 赤系発色 a(60~30)

(1) 分析土壌の調整

- ① 圃場から通常の栽培状態の土を100g程度採取する。

ポイント

- ・雨後や乾燥でない土を採取
(水分が25%の土)
- ・作物の根が張る深さを採取
(20cm程度の深さは必要)



- ② 採取した土を良く混ぜ、小石や残根、異物を取りのぞき1mmのふるいで細粒化する。

- ③ サンプル用土を1g試験管(小)に入れる。



- ④ 試験管(小)に水2mlを加えてよく混ぜる。(測定元素分必要)

- ⑤ にごりの無くなった上清を1ml採取して分析に使用

(2) 土壌の分析 (1mlの上清使用)

① $\text{NH}_4\text{-N}$ (アンモニア態)

ネスラー試薬 2滴
(50 μl $\times$ 2)



② $\text{NO}_3\text{-N}$ (硝酸態)

GR硝酸試薬
取き (25mg)



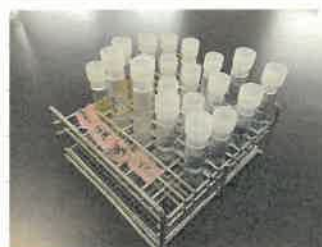
③ P_2O_5 (リン酸)

1液 (モリブデン酸)
~~4滴 (50 μl $\times$ 4)~~
20 μl /ml
2液 (塩化スズ)
~~2滴 (50 μl $\times$ 2)~~
10 μl /ml



④ K_2O (カリ)

テトラフェニル液
~~2滴 (50 μl $\times$ 2)~~
10 μl /ml



[酒米DNAの回収量測定 ①]

2022年10月12日 (水)

Pharmacia GeneQuant II

① リファレンス測定 (TEバッファ)



50ul セルに分注



TEを計測

260nm 0.000AU

- (1) Set ref キーを押す
- (2) Insert reference
- (3) セルをセット
- (4) Remove reference

↓
ABSORBANCE 260nm 0.000AU

(5) 測定準備完了

② サンプル計測 (50ul)

↑ 数4.15

DNA : TE 2ul : 98ul

- (1) Sample キーを押す
- (2) Insert Sample
- (3) セルをセット (石英セル)
- (4) Remove Sample

↓
260nm / 280nm

1.8 でDNA純度が高い



260/280 比
1.8 基準値

260nm 吸光度
(Absorbance)

Set ref キー
Sample キー

DNA 回収濃度
(ug/ml)

(260/280) (ug/ml)

系統	260nm	Ratio	DNA Conc.
4a	0.053	1.580	30.9
4b	0.064	0.885	36.5
4c	0.033	0.490	0.0
4d	0.294	1.808	197.7 ○
4e	0.113	1.718	46.0
4f	0.191	1.680	128.0 ○
4g	0.066	1.897	31.9
4h	0.178	1.579	93.1
4i	0.278	1.827	178.1 ○
4j	0.136	1.646	93.3
10a	0.886	1.856	450.8 ○
10b	1.267	1.993	615.9
10c	0.659	1.932	366.8
10d	0.122	2.154	30.4
10e	0.184	1.845	88.6
10f	0.164	2.451	84.4
10g	0.151	1.671	79.1
10h	0.358	2.047	160.7
10i	0.082	1.663	58.9
10j	0.215	1.766	174.1 ○
14a	0.171	1.753	185.8
14b	0.154	2.088	69.0
14c	0.129	1.739	192.7 ○
14d	0.260	1.821	205.5 ○
14e	0.140	1.599	146.3
14f	0.114	1.435	94.3
14g	0.060	1.635	44.2
14h	0.100	1.533	69.1
14i	0.241	1.964	135.5
14j	0.993	1.732	527.6 ○
22a	0.238	1.846	140.2
22b	0.106	1.836	102.8
22c	0.057	2.639	40.5
22d	0.143	1.991	89.1
22e	0.217	1.830	192.0 ○
22f	0.914	1.895	502.6 ○
22g	0.556	2.035	334.0