

## 1. 培地の作製と無菌操作

令和1年7月8日

微生物は、生命科学や医学、農学、工学などの面からとりあげられ、くわしく研究されているが、その他に生物の基本的な諸現象を解明していくための研究材料として欠かすことのできないものとなってきた。それは、微生物に次のような利点、特質があるからである。(1)実験室で比較的容易に、また純粋に培養できること。(2)試験管内での実験に用いやすいこと。(3)一般に大量の細胞を用いるので、個々の生体の個体差といった面を考えないでよいこと。(4)個体の life cycle が比較的短く、増殖が盛んであること。(5)高等な生物にくらべて、その体制、構造や、活性が簡単であるが、生物としての基本的な生命現象(エネルギー代謝、物質の合成、分解、遺伝など)は共通していること。(6)しかも一方では、他の生物にみられない、微生物特有の種々の活性を示すこと。したがって、生命科学の諸分野においても、実験材料として微生物を用いることは非常に多く、その取り扱いは今後研究を行う者にとって、基本的な技術の一つといえる。ここでは、微生物の代謝、遺伝、免疫などは他の機会にゆずって、主として培地の作製、細菌の無菌操作法、培養、同定などの基礎的な知識、技術を習得することを目的とする。

**1. 一般的な注意** 微生物を取り扱う際に、最も大切なことは、純粋な培養、つまりめざす微生物以外の生物が混在 (contamination) していない材料を得ることである。このための実際上の注意は、実習の各段階で述べるが、その他に次のような点に絶えず気を配ることが必要である。(1) 実験室を常に整頓し、清潔に保つ。(2) 無菌状態にあるもの、そうでないものをはっきり確認し整理しておく。(3) 実験計画ははじめにしっかりたてて、必要な滅菌器具、培地、種菌などが実験途中で不足することがないようにする。(4) 危険な病原菌を使用する際は、絶えず感染について注意しなければならない。

**2. 菌の培養** 与えられた菌や、また分離した菌を純粋培養する。

### a.滅菌(Sterilization)

他の微生物の混入をさけるためには、第一に使用する器具、培地はすべて無菌的な状態にしておかなければならない。普通用いられる滅菌法には次のようなものがある。

- (1) 乾熱滅菌 ガラス器具、金属、陶器類は乾熱滅菌器で滅菌する。試験管、三角フラスコ、坂口フラスコなどは綿センまたは金属のフタをしておく。滅菌は 180℃、2 時間加熱を行う。
- (2) 高圧蒸気滅菌 培地などは高圧蒸気釜(autoclave)を用い、2 気圧、121℃で 20 分から 30 分加熱する。
- (3) 煮沸滅菌 100℃の湯または蒸気で滅菌する。この程度では滅菌が不完全なので、1 日 1 回ずつ 3 日間連続して行うこともある。
- (4) ろ過滅菌 加熱できない液体の滅菌に用いる。微生物が通過できないような小さい孔

をもつフィルター(0.2~0.45 $\mu$ m)を通過させて液体を無菌的にするものである。

- (5) 化学的滅菌 ゴム、合成樹脂などの滅菌。0.1% $\text{HgCl}_2$ 、5%フェノール、アルコールなどが用いられる。
- (6) 火炎滅菌 白金耳(線)、試験管の口など。
- (7) 紫外線滅菌 クリーンベンチ、安全キャビネット、無菌室など。

#### b. 培地 (Culture medium)

微生物を生育させるに、必要かつ十分な養分を含む、無菌的な培地をつくる。培地には、微生物の種類や状態、または実験目的によって非常に多くの種類があるが、ここでは一般細菌培養や遺伝子組み換え実験(大腸菌など)によく用いられる LB(Luria-Bertani)培地をつくる。

- (I) LB 液体培地 Yeast Extract 0.5 g、トリプトン 1.0 g、NaCl 1.0 g を蒸留水 100mL に溶かし、HCl、NaOH で pH を 7.2 にあわせる。50mL ずつ容器に分注後、高圧蒸気滅菌を行う。その後、低温にて保存する。
- (II) LB 寒天培地 上記の LB 液体培地に、寒天末を 1.5 ~2%(w/v)を加えて高圧蒸気滅菌を行う(今回は 1.5%)。その後、50 $^{\circ}$ C程度まで冷まし、プラスチックシャーレに流し込み、15~20 分程度放置し固化させる。培地側を上にして重ね、低温で保存する。

#### c. 分注 培地は、使用目的に応じて、滅菌してある培養フラスコ、シャーレや試験管に分注する。滅菌後の培地の取り扱いは、安全キャビネットやクリーンベンチなど無菌的な環境下で、滅菌した器具(チップ、メスピペットなど)によって行う。(I) 試験管、培養フラスコへの分注 (LB 液体培地)

(I)液体培地は滅菌した試験管にだいたい2~10ml 前後入れる。管の口の近くの壁にふれないように注意する。培養フラスコへの培地の分注は、最大容量の 5 割以下に抑える。いずれもその後、高圧蒸気滅菌を行い、使用時まで低温で保存する。滅菌済みの培地の場合には、無菌的な環境下で、滅菌した器具を用いて、滅菌した容器に分注する。

#### (II)斜面、高層培地 (図 1)

寒天培地は加熱してとかしてから試験管に分注する。冷却の際の固まらせ方で斜面培地、高層培地の区別がある。

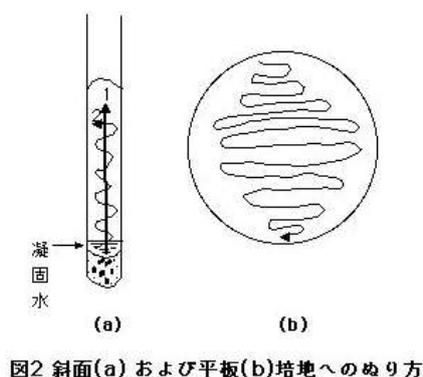
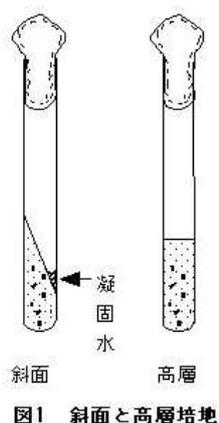
#### (III) 平板培地(LB 寒天培地)

この場合は、分注後、滅菌操作が行えないので、無菌的に分注する必要がある。滅菌したシャーレのフタを少し開いて、50 $^{\circ}$ Cに保った寒天培地をシャーレの高さの半分まで注ぎ込み、軽く水平に振ってたいらにして固まらせる。保存、培養時とも培地側を上にする(蒸発した水分で、培地面を乱さないため)。

#### d. 接種 または植菌 (Inoculation)安全キャビネットやクリーンベンチなど無菌的な環境下で、培地に菌を植える。

#### (I) 試験管液体培地への接種

- (1) 元の菌の植えてある液体培地から、滅菌チップをつけたマイクロピペットにより 100uL 程度をとり、これから植えようとする液体培地に入れる。バーナーの炎の上部で軽く試験管の口を熱し、ふたをする。
  - (2) 元の菌が寒天培地上の菌の場合、白金耳を火炎滅菌してから十分冷やし、元の寒天培地より菌をとり、これから植えようとする適当量の液体培地に懸濁する。バーナーの炎の上部で軽く熱し、ふたをする。
  - (3) 接種が終わったら、白金耳も火炎滅菌しておく。
- (II) 平板培地への接種菌の分離を目的として平板培地に菌を塗布する。菌をつけた白金耳は、図 2(b)に示すような手順で、シャーレの片隅に密に塗って、大半の菌をこの部分につけ、ついで中央から他の半分には、比較的時間をおいて、線が交わることのないように塗っていく。平板の表面に傷をつけないこと。周囲は少しあけて塗ることに注意。フタ側を下にして培養する。
- e. 保温 (Incubation) 菌を植えた培地を適当な温度に保てば、菌は増殖を開始する。普通 30℃から 37℃に温度を調整した保温器を用いる。培地の滅菌が完全かどうか確かめるために、接種してない培地も入れておいて対照とするとよい。



### 3. 培地の作製と、大腸菌および納豆菌の植菌・培養 (4人一組)

今回の実験では、大腸菌および納豆菌を用いて、LB 液体培地、LB 寒天培地を使い植菌・培養を行う。

- [準備] (1) 細菌 ; *E.coli* (大腸菌)、*B.natto* (納豆菌)  
 (2) 滅菌シャーレ、滅菌コニカルチューブ、滅菌チップ  
 (3) 三角フラスコ、オートクレーブ、保温器、白金耳

#### [実験]

- (1) LB 液体培地を、各班 100mL ずつ作る。三角フラスコに 50mL ずつ分注し、アルミ箔でフタをした後、高圧蒸気滅菌する。
- (2) LB 寒天培地を、各班 100mL を作る。高圧蒸気滅菌後、シャーレに流し込み、LB

寒天培地を作る。

- (3) 大腸菌および納豆菌の種菌を、各々2mL の LB 液体培地に植菌する。37℃, 終夜培養を行う。
- (4) 大腸菌および納豆菌の種菌を白金耳でかきとり、1mL の LB 液体培地に懸濁後、LB 寒天培地にそれぞれ塗布する。37℃, 終夜培養を行う。

\* LB 寒天培地で培養したものは、グラム染色による形態観察の実験に用いる。

\* LB 液体培地で培養したものは、タンパク質、酵素の定量実験に用いる。

\* 培養した結果を、写真等で記録する。

\* 大腸菌、納豆菌の特徴について調べておくこと。

\* \* この資料と結果は、manaba からダウンロードできます。

<https://manaba.lms.tokushima-u.ac.jp/>

または生物化学研究室 HP からダウンロードできます。

<https://satokichi2012jp.wixsite.com/biochem> →担当授業

## 2. 細菌の培養と染色法

令和1年7月16日

前回までの実習では、微生物の取り扱いに必要な培地調製法や、基本的な無菌操作法について行った。この実習では、液体培地による細菌の増殖過程を検討し、さらに細菌の増殖に必要な各種染色法を通し、細菌の増殖や観察に関する基礎的な知識、技術を習得することを目的とする。

### 2-1. 細菌の成長曲線（グループ内で分担を決める）

細菌の増殖は、誘導期、対数増殖期、静止期、死滅期からなる（下図）。この細菌の増殖の過程は、細菌の種類や培養条件（温度、pH、栄養素、共存物質の有無など）によって大きく異なる。細菌の増殖（細胞数）を検出する方法は、混釈（希釈）法、濁度測定、細菌内の特定の物質（ATP など）を検出する方法などがある。ここでは大腸菌および納豆菌を用いて、LB 液体培地による細菌の増殖を、660nm における濁度(Optical density:OD)を用いて検出する。

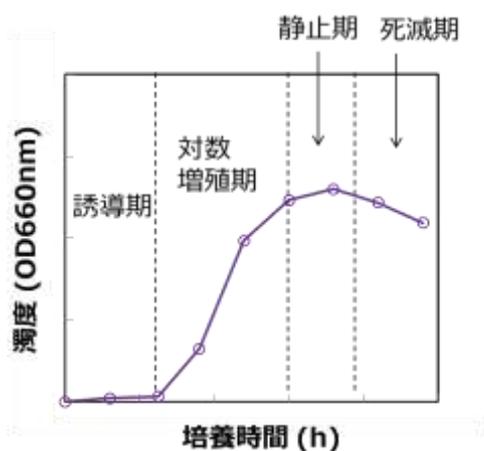


図 2-1 細菌の成長曲線の例

#### [準備]

- (1) LB 液体培地で前培養した細菌 (1mL 使用)  
*E.coli* (大腸菌)、*B.natto* (納豆菌)
- (2) 滅菌した LB 液体培地(50mL) 2本
- (3) 吸光度計、プラスチックキュベット、保温器

#### [実験]

- (1) 吸光度計を準備し、波長を 660nm にセットする。その後、LB 液体培地で吸光度 0 にセットする。以後、吸光度計は各班で同じものを使用する。
- (2) LB 液体培地で前培養した大腸菌および納豆菌をそれぞれ 1mL 取り、前回滅菌した LB 液体培地に無菌的に加える。懸濁後、それぞれ 1.5mL をプラスチックキュベットに入れ、660nm における吸光度を測定する (Time=0 とする)。
- (3) 37℃, 135rpm. で振とう培養し、一定時間ごとに各細菌培養液を 1.5mL 採取する。それぞれ 1.5mL をプラスチックキュベットに入れ、660nm における吸光度を測定する。

- (4) 対数増殖期に差し掛かった場合には、30分毎に、(3)の測定を行う。
- (5) 静止期になるまで、測定を繰り返す。その後、15分間氷冷し、遠心分離(5000rpm, 15分, 4℃)で、各細菌を集菌する。培地上清を捨て、菌体を-20℃で保存する。

- \* 細菌培養液の採取は、クリーンベンチ内で行う。測定後の培養液およびプラスチックキュベット洗浄液は、所定の容器に捨てる（流しに捨てないこと）。
- \* 細菌ごとに、各培養時間の濁度(660nmの吸光度)を記録しまとめる。

## 2-2. 細菌の観察法（グループ内で分担を決める）

培養した細菌を見るためには、無染色標本または染色標本を作製し、光学顕微鏡で観察する。顕微鏡は正しく操作しないと、見たいものが見えないばかりでなく、故障や破損を起こすから器械の構造や性能をよく理解して、慎重に扱わねばならない。

### 1. 無染色標本の観察（直接観察）

大型の微生物は、特に染色しなくても十分に顕微鏡で観察しうる。細菌もある程度は無染色で調べることができる。スライドガラスに蒸留水を1滴のせ、微量の検体を混ぜる。カバーガラスをかぶせて、顕微鏡で観察する。菌の運動性に注目すること。

### 2. 染色標本の観察

適当な色素で、細胞全体や、孢子（芽胞）、きょう（莢）膜、べん（鞭）毛などを染め分けて観察する。細菌細胞の染色には、単染色、グラム染色、芽胞染色などがあるが、ここではグラム染色法で行う。グラム染色は、菌と塩基性色素の親和力（affinity）のちがいで染色の様子が異なり、これを菌の判定に用いる。グラム染色でゲンチアナバイオレット、クリスタルバイオレットの色に染まるもの（青紫色）をグラム陽性菌といい、大半の球菌、ジフテリア菌、孢子形成かん(桿)菌、酵母、かびなどがこれに属する。また対比色（赤色）に染まるものをグラム陰性菌といい、双球菌の大半、腸内桿菌、緑膿菌などがこれにはいる（下図）。

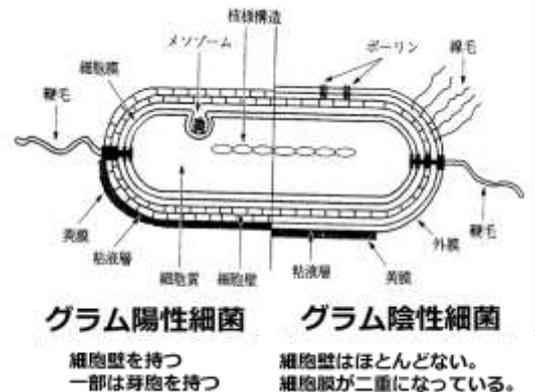


図 2-2 グラム陽性細菌とグラム陰性細菌の細胞構造

[準備]

- (1) LB 寒天培地で前培養した細菌  
*E.coli* (大腸菌)、*B.natto* (納豆菌)

- (2) 白金耳（イノキュレーションループ）、カバーグラス、スライドグラス
- (3) 蒸留水、光学顕微鏡
- (4) Gram-color staining set (Merck)

[実験]

- (1) 前培養した大腸菌および納豆菌の直接観察を行い、結果を記録する。
- (2) 前培養した大腸菌および納豆菌のグラム染色を行い、結果を記録する。

【グラム染色法】

- (1) スライドグラスに蒸留水を数滴のせる。
- (2) LB 寒天培地で前培養した大腸菌および納豆菌を、白金耳を用いて少量かきとり、(1)の蒸留水に懸濁する。
- (3) カバーグラスを用いて薄く塗まつする(グラム染色では特に気をつけて、一様にうすく塗まつすること)。余分な液は吸い取り、所定の場所に捨てる。
- (4) 火炎バーナーの炎上部で、(3)を乾燥・固定し、十分に冷ます。一点のみ加熱するとスライドグラスが破損しやすいので、全体を熱するように振りながら加熱する。やけどに注意する。
- (5) 固定部分に①液(Crystal violet)を滴下し、1分放置する。
- (6) ②液(Lugol 液)で洗浄する。
- (7) ②液を滴下し、1分放置する。
- (8) 蒸留水で5秒軽く洗浄する。
- (9) ③液(脱色液)を載せ、15秒振る。
- (10) 色素が浮き出なくなったら、蒸留水で5秒軽く洗浄する。
- (11) ④液(Safranin)を滴下し、1分放置する。
- (12) 蒸留水で5秒軽く洗浄する。
- (13) 乾燥し、染色標本（プレパラート）の余分な色素をふき取っておく。
- (14) 光学顕微鏡で観察する。結果を記録する。

\* この資料と結果は、manaba からダウンロードできます。

<https://manaba.lms.tokushima-u.ac.jp/>

または生物化学研究室 HP からダウンロードできます。

<https://satokichi2012jp.wixsite.com/biochem> →担当授業

### 3. 細菌粗抽出液のタンパク質定量と酵素活性測定

令和1年7月29日

生体内の生命現象を理解するために、対象となる生物の細胞から抽出液を作製し、その中の生体高分子の分離・精製や分析を行うことがしばしば必要とされる。とりわけタンパク質や酵素の検出や分析は、その基本となる技術である。

ここでは細菌細胞粗抽出液を用いて、タンパク質濃度を決定する Bradford 法と、生体内で必須酵素である無機ピロリン酸加水分解酵素の活性測定を行い、タンパク質・酵素の測定法について学ぶこと目的とする。

#### 3-1. 細菌抽出液の調製とタンパク質定量

細胞破碎の方法は、界面活性剤を用いる方法や浸透圧差を利用する方法、高圧破碎法などがあるが、本実験では超音波破碎により、前回培養した大腸菌および納豆菌を用いて細胞粗抽出液を調製する。

さらに調製した大腸菌および納豆菌粗抽出液のタンパク質濃度を定量し、総タンパク質量を算出する。タンパク質の定量法には下記の表のように様々な方法があるが、ここでは比較的簡便な色素結合法(Bradford 法)を用いて、タンパク質の定量を行う。用いる色素は Coomassie Brilliant Blue(CBB)で、タンパク質と結合する能力が強く、タンパク質を分離検出する方法であるポリアクリルアミドゲル電気泳動後の染色などにも用いられる。

表 3-1 タンパク質定量法

方法	原理
ビウレット法	$\text{Cu}^{2+}$ がアルカリ溶液中でポリペプチドと錯体を形成し呈色する。
Lowry法	チロシン、トリプトファン、システインとフェノール試薬の反応をビウレット法と組み合わせた。
ビスニコニン酸法(BCA法)	アルカリ溶液中で $\text{Cu}^{2+}$ がペプチド結合、チロシン、トリプトファン、システインによって還元される $\text{Cu}^+$ を定量する。
色素結合法(CBB法)	タンパク質と色素(CBBなど)の結合により、色素のスペクトルが変化する。
ニンヒドリン法	加水分解後、アミノ酸をニンヒドリンと反応させる。
蛍光法	フルオレサミンが一級アミンと反応し、蛍光物質となることを利用。

このCBBは通常は赤色であるが、タンパク質と結合し青色に呈色する( $\lambda=595\text{nm}$ )。こうした定量法では、目的物質濃度と発色の程度(特定波長での吸光度)の関係(検量線)を求め、その関係を利用して、未知試料の吸光度から目的物質の濃度を求める。ここでは、標準タンパク質(ウシ血清アルブミン)の濃度と、呈色した595nmでの吸光度の関係を下記のようにあらかじめ求めてあるので、これを利用する。

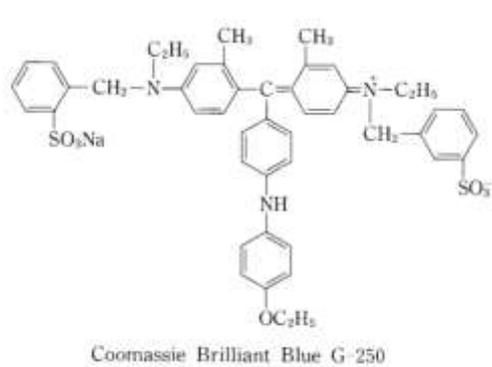


図3-1 CBBの化学構造

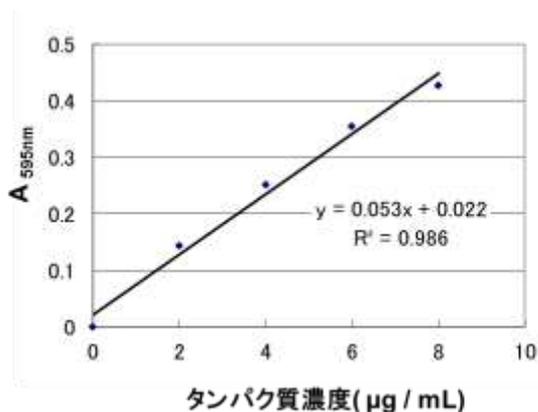


図 3-2 Bradford 法による検量線

#### [準備]

- (1) LB 液体培地で培養した *E.coli* (大腸菌)、*B.natto* (納豆菌)
- (2) 超音波破碎機、遠心分離機
- (3) 吸光度計、プラスチックキュベット
- (4) マイクロピペット P-1000, ブルーチップ、試験管 7 本 (大腸菌用 3 本、納豆菌用 3 本、対照)
- (5) Buffer A (20mM Tris-HCl pH8.0)、CBB 液(Protein-assay 試薬, Bio-RAD 社)

#### [実験]

##### 【各細菌の粗抽出液の調製】

- (1) 前回集菌した各細菌を解凍し、10mL の Buffer A で懸濁する。
- (2) 超音波破碎(30 秒×3 回)により細胞を破碎する。
- (3) 8,000rpm, 20 分、4℃で遠心分離を行い、上清(粗抽出液)を回収する。

##### 【タンパク質の定量】

- (1) 上記で調製した各細菌の粗抽出液を 40 µL 取り、Buffer A 7.96mL を加え希釈する(200 倍希釈液)。よく混合する。
- (2) (1)の各細菌抽出希釈液を、3 本の試験管にそれぞれ 2mL ずつ分注する。  
(大腸菌用 3 本、納豆菌用 3 本)

- (3) 対照用に、Buffer A 2mL を別の試験管に分注する。
- (4) (2),(3)の試験管に、CBB 液を 200 $\mu$ L ずつ加え、よく混合する。
- (5) 室温で 5 分間放置し、595nm における吸光度を測定する。
- (6) 上記図 3-2 の検量線より、それぞれの細菌粗抽出液のタンパク質濃度およびタンパク質量を求める。

### 3-2. 細菌抽出液の酵素活性測定

体内で必須である polymerase(DNA,RNA)は、ヌクレオチドを一つ伸長するごとに一分子のピロリン酸(ニリン酸, P<sub>Pi</sub>)を放出する。この反応は可逆的であるため、効率よく polymerase が作用するためには、この P<sub>Pi</sub> を分解する酵素が必要となる。無機ピロリン酸加水分解酵素(PPase)は動植物から細菌にいたるまであらゆる生物に見られ、二価金属イオン存在下で P<sub>Pi</sub> を二分子のリン酸(P<sub>i</sub>)に分解する。ここでは、PPase を含む大腸菌の抽出液の活性測定を行い、生成したリン酸を、モリブデン青法(peel 法)により定量する(比色定量)。ここでは、生成したリン酸とモリブデンおよび銅の錯体をアスコルビン酸で還元させることにより発色させ、700nm で吸光度を測定する。

#### [準備]

- (1) 吸光度計、ガラスセル
- (2) メスピペット、安全ピペッター、マイクロピペット P-1000, ブルーチップ、試験管 7 本 (大腸菌用 3 本、納豆菌用 3 本、対照)
- (3) 基質溶液 (40mM Tris-HCl 緩衝液(pH 8.0)、1mM P<sub>Pi</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>)
- (4) B 液 (3% HClO<sub>4</sub>、反応停止剤)
- (5) C 液 (5 $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>, 酢酸緩衝液に溶解)
- (6) D 液 (1%モリブデン酸アンモニウム)
- (7) E 液 (2%アスコルビン酸ナトリウム)
- (8) 調製した各細菌粗抽出液 (氷冷しておく)
- (9) Buffer A (20mM Tris-HCl pH8.0)

#### [実験]

- (1) 試験管 7 本に、それぞれ基質溶液 500 $\mu$ L を分注する。
- (2) 上記で調製した細菌粗抽出液 30 $\mu$ L を、3 本の試験管にそれぞれ加え、よく混合する(大腸菌用 3 本、納豆菌用 3 本)。
- (3) 対照として、Buffer A 30 $\mu$ L を対照用試験管に加え、よく混合する
- (4) (2),(3)の試験管を、37 $^{\circ}$ C, 10 分間保温する。
- (5) 各試験管に B 液を 500 $\mu$ L ずつ加え、よく混合する。
- (6) 各試験管に C 液を 3mL ずつ、安全ピペッターとメスピペットを用いて、それぞれ加え、よく混合する。

- (7) 各試験管に D 液を 300 $\mu$ L ずつ加え、よく混合する。
- (8) 各試験管に E 液を 200 $\mu$ L ずつ加え、よく混合する。
- (9) 室温で 10 分間放置し、700nm の吸光度を測定する。
- (10) 下記より酵素活性(units/ml)および比活性(units/mg)を求める。

【活性の定義】

無機ピロリン酸を基質として、pH8.0, 37℃で、1分間に 1 $\mu$ mol の Pi を生成させる酵素活性を 1unit とする。

試料溶液中の酵素活性は、

$$\text{酵素活性 (units/mL)} = 3.80 \times (\text{700nm の吸光度}) \times \text{希釈率}$$

酵素 1mg あたりの酵素活性(比活性)は、

$$\text{比活性(units/mg)} = \text{酵素活性(units/mL)} / \text{タンパク質濃度(mg/mL)}$$

## 3-2. Microsoft Excel を用いたデータ整理

実習や研究の過程で得られた種々の実験結果について、測定データの整理とグラフの作成、それらを元にしたレポート作成やプレゼンテーション用の作図は、実験を纏める上で重要な知識および技術である。ここでは、これまで行ってきた実験結果について、Microsoft Excel を用いたグラフの作成法と平均値、標準偏差の算出法を学ぶこと目的とする。

### 3-2-1. グラフ・表の作成(1) 散布図の作成

実習 2 で実施した細菌の成長曲線の測定データを用いて、基本的なグラフの作成を行う。基本的なグラフには、棒グラフ、円グラフ、帯グラフ、折れ線グラフ、散布図などがある。実際のデータをもとに、グラフのそれぞれの特性に応じて使い分けが必要である。

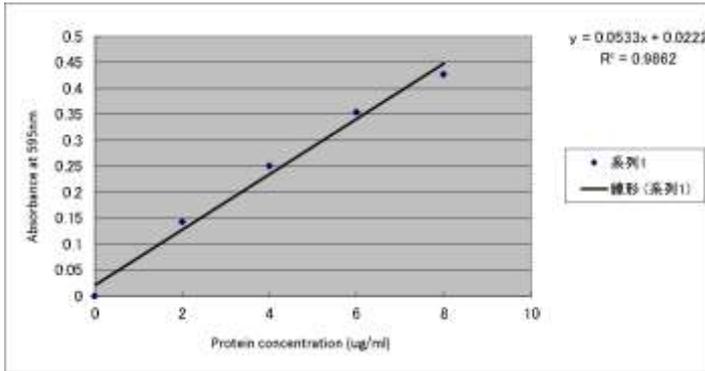
(1) 棒グラフ：同一の基線から出発した同幅の棒の長短（高低）で数量間の大小を比較する。特徴は、大小関係や順位などが直感的にわかりやすい、「目盛り」や「目盛り線」が使用できる、複合棒グラフや積み上げ棒グラフで情報量を増やせるなどである。

(2) 円グラフ：全円を 100%とし、中心角によって作られる内訳面積の広さで構成比を表現する。特徴は、データの構成比をグラフ上の面積比で直感的に把握できる、直線の多い紙面で円グラフを用いると視覚的バランスがよいなどであるが、グラフに数値目盛りを入れることができない、複数の属性データを 1 つのグラフに示すのがむずかしいなどの欠点もある。

(3) 帯グラフ：長方形の全面積を 100%とし、各部分の面積の広さで構成比を表現する。特徴は、円グラフでは難しい目盛りが設定できる、異なる集団の構成比を比較しやすい、複数の帯グラフを並べることで紙面を節約できるなどである。

(4) 折れ線グラフ：時系列データについて、各時点の値を折れ線で結んで値の推移を表現する。特徴は、複数の折れ線を引くことで異なる項目について比較が容易、順位の変化を表すことができるなどであるが、横軸の設定が項目ごと（数値ではなく）で表示されるため、実験データのグラフ化には一般的には使わない。

(5) 散布図：2 つの量的データの関連（相関）をとらえるため、一方の値を横軸に、もう一方の値を縦軸にとり、各データを対応する座標に印をつけたグラフである。特徴は複数のデータ間の関連を視覚化して直感的に把握しやすくするが、全く同じ値  $(x_i, y_i)$  のデータが複数存在するときは点が重なって表現しにくいなどの欠点もある。測定データのグラフでは、横軸の変数と縦軸の変数の関係（相関）を見るため、一般的にはこの散布図を用いて作図する。



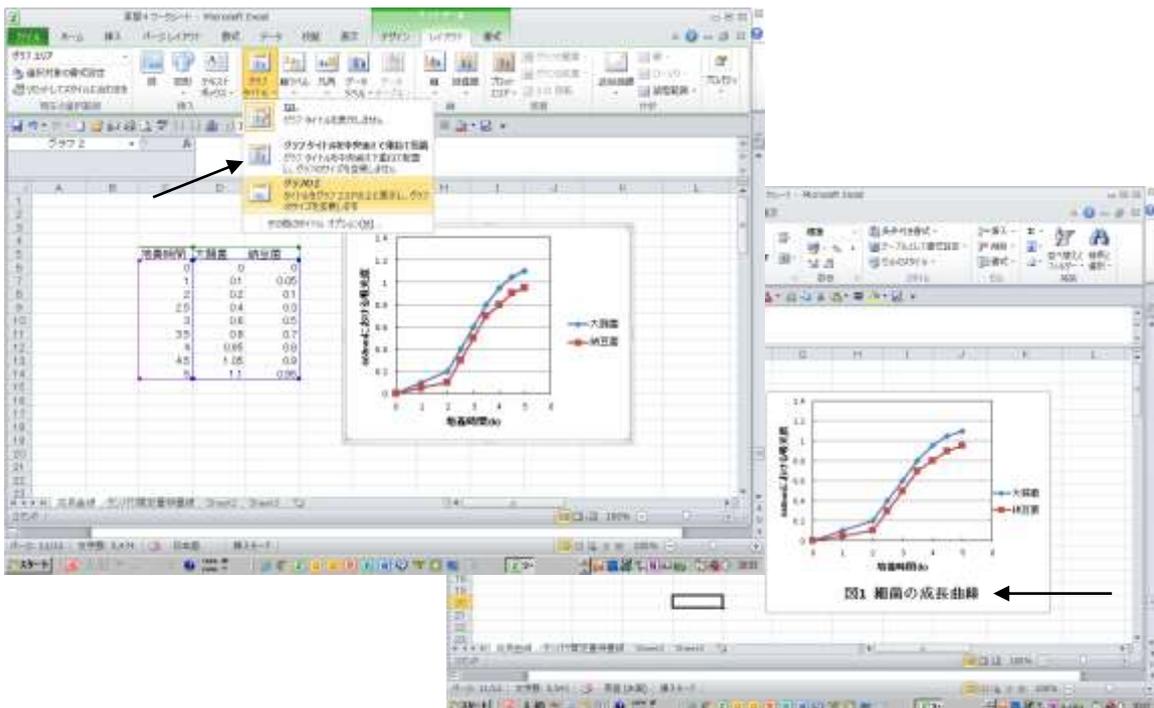
横軸、縦軸である関係を見る時に、線を引く。  
(図では直線関係を見ている)

(演習)

実験 2：大腸菌および納豆菌の成長曲線の作図

実験 2 で行った大腸菌および納豆菌培養液の濁度の測定データを用いて、散布図により、各細菌の成長曲線のグラフを作成する。

- (1) ワークシートの「成長曲線」タブを開く。
- (2) ワークシートのセルのうち、「培養時間」列に測定時間を入力する(x 軸に相当する)。
- (3) ワークシートのセルのうち、「大腸菌」および「納豆菌」列に各測定値を入力する (Y1,Y2 に相当する)。
- (4) ワークシートのデータを選択し、「挿入」タブ→グラフ「散布図」→「直線とマーカー」を選択する。大腸菌、納豆菌それぞれのグラフが表示される。
- (5) 線の太さや記号のサイズなどを調整する。図のタイトルは、グラフエリアをクリックし、グラフツール「レイアウト」→「グラフタイトル」→「グラフの上」を選択し、グラフタイトルを記入する。その後、グラフの下にタイトルを配置する。



## -2. グラフ・表の作成(2) 最小二乗法

上記に述べたように、横軸(x 軸)と縦軸(y 軸)のデータを散布図で表し、両者に直線関係があるかを検証する方法に最小二乗法がある。ここでは、タンパク質定量で用いた Bradford 法の検量線を例として、直線の外挿法について学ぶ。

【最小二乗法】 誤差の二乗和を最小とする直線式を求める。

### 実験、観測データの解析

$$ax_1 + b = y_1 + \varepsilon_1$$

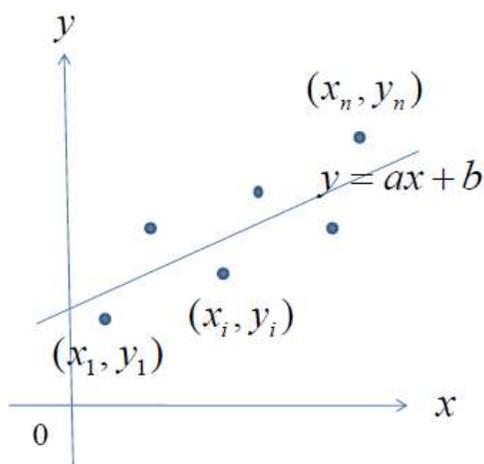
$$ax_2 + b = y_2 + \varepsilon_2$$

⋮

$$ax_n + b = y_n + \varepsilon_n$$

誤差の二乗和を最小にする。

$$\sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \sum_{i=1}^n (ax_i + b - y_i)^2 \rightarrow \text{最小}$$



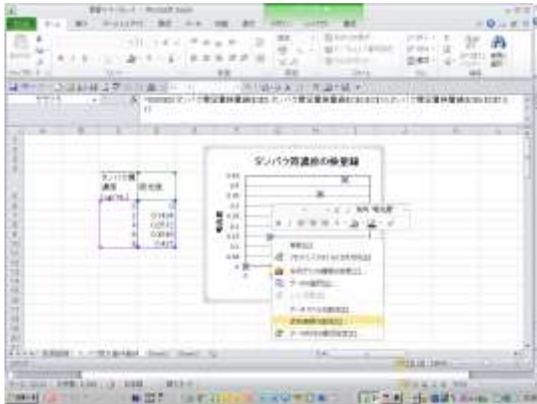
速水ら、最小二乗法の今と昔 - 国立情報学研究所 (2008)  
[www.nii.ac.jp/userdata/openhouse/h20/pdf/presentation\\_hayami.pdf](http://www.nii.ac.jp/userdata/openhouse/h20/pdf/presentation_hayami.pdf)

(演習)

実験 3 : タンパク質の定量(Bradford 法)の検量線の作成

実験 3 で行ったタンパク質濃度の定量 (Bradford 法)で示した、標準タンパク質 (BSA)のタンパク質濃度と、発色溶液の 595nm の吸光度の関係を用いて、検量線を作成する。

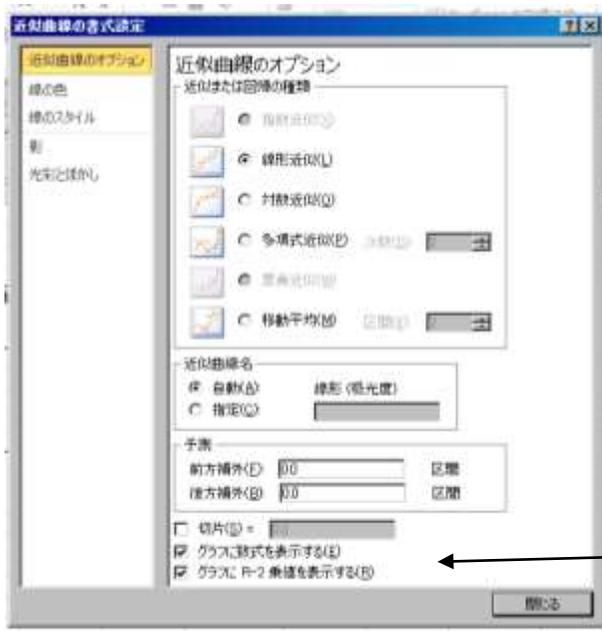
- (1) ワークシートの「タンパク質定量検量線」タブを開く。
- (2) 実際の値より散布図が示されているので、プロットエリアの測定点 (どの点でもよい) をクリックする。
- (3) 測定点にカーソルを合わせ、右クリック→近似曲線の追加を選択する。



(4) 「近似曲線のオプション」 → 「線形近似」を選択。「グラフに数式を表示する」



および「グラフに R2 乗値を表示する」にチェックを入れる。



\*この資料と結果は、manaba からダウンロードできます。

<https://manaba.lms.tokushima-u.ac.jp/>

または生物化学研究室 HP からダウンロードできます。

<https://satokichi2012jp.wixsite.com/biochem> →担当授業