

<目次>

第 1 号	抗体などの保管, 分注
0. 基本的な心得	個人専用の溶液
研究テーマと指導体制	
実験室に出てきたら (仕事を始める前に)	4. 蒸留水作成と滅菌
実験室から帰るとき (仕事が終わったあとに)	蒸留水の作成
実験室と理学部 1 号館の施設	オートクレーブ
仕事の時間帯	乾熱滅菌
教員との連絡	
セミナーと研究室の公式行事	5. 顕微鏡観察法
	顕微鏡の配置, レンズの割り当て, 部品の収納
1. 室内の整頓と清掃	場所
当番の役割	実体顕微鏡
ごみの分別と廃棄	光学顕微鏡
	蛍光顕微鏡
2. 器具の取扱いと洗浄	顕微鏡の保守, 清掃
器具の取扱い	
洗い物	6. 写真撮影と現像
器具の収納場所	顕微鏡写真撮影
	フィルムの現像
3. 試薬や溶液の取扱い	焼付け
保管場所	
計量	7. ネットワークの利用
溶液の作成	パソコンの IP アドレス設定
pH の調整	プリンタの設定
溶液の保管, 廃棄	

0. 基本的な心得

研究テーマと指導体制

卒業研究のテーマは年度始めに教員より提示するので、学生間の話し合いなどにより自分のテーマを選択する。

テーマは 3 名の教員がそれぞれ設定するが、設定した教員に限らず全ての教員が大なり小なり全員の卒業研究の指導に関わることになる。

テーマによっては複数の学生が選択できないものもある。

また、研究の経過によっては教員と相談の上多少の変更が起こりうる。

実験室に出てきたら（仕事を始める前に）

急を要する場合以外は自分の仕事を始める前に研究室全体の仕事を行う。

例えば、乾燥を終えた洗い物の片付け、蒸留水作成、乾熱滅菌を終えた器具の片付けなどが残っているのを見つけたら、まずそれを済ませてしまう。

実験室から帰るとき（仕事が終わったあとに）

使用した実験台の上が溶液、試薬、試料などで汚れている場合は、清掃する。

自分が使用した器具、試薬、機器を元通りに片付ける。

（ただし、明日も連続して実験をする場合などやむを得ないときには出したままにしても構わない。その際は、誰が使用しているのかを分かるようにしておく）

最後に実験室を退出する人は、

- ・火の元（ガス器具、元栓）、
- ・戸締り（ドア、窓）、
- ・室内の照明
- ・瞬間湯沸器の水道とガスの元栓
- ・その他使用していない機器の電源（蛍光灯、顕微鏡の励起光など）

を確認する。

ただし、研究室に教員が残っている場合はこの限りではない。その際は教員のひとこと断ってから退出する。

実験室と理学部 1 号館の施錠

実験室や研究室から全く人が居なくなるときは施錠する。

このため、他の人が残っていて一時的に外出する場合でも必ず鍵を持って出る。

夜間や休日は理学部 1 号館の出入り口の施錠を確実に行う。

仕事の時間帯

特に始業時刻、就業時刻は設けない。

休暇、就職活動、進学準備などで数日以上実験室に出てこない場合は事前に教員に連絡をしておく。

教員との連絡

研究室全体の連絡は、直接対面にて、研究室内の掲示、あるいは電子メールにより行う。

セミナーと研究室の公式行事

セミナーは週 1 回、平日に行う。日程と担当者は決まり次第掲示される。

担当者だけでなく、やむを得ない場合を除いて研究室のメンバーは出席し、討論に参加しなければならない。

担当者は各自の研究に関連する文献を事前に研究室内に掲示し、セミナー当日は摘要、文献の図などを用いて研究室のメンバーに分かりやすく紹介する。

資料は、印刷物（コピー）や OHP、スライド、パソコン（液晶プロジェクタ）など適切な方法を用いて参加者に提示する。

1. 室内の整頓と清掃

実験室を清掃するときは、床のごみを掃除機で取り除く。

(ホコリが立たないように注意する。)

実験台上の全体の汚れを、きれいな雑巾あるいはペーパータオルでふき取る。

手で持って動かせるものは移動させてその下もきれいにする。

ごみの分別と廃棄

ガラス、金属のごみは各実験室の容器（一斗缶を切り開けたもの）に捨てる。

空き缶は平らにつぶしてから捨てる（つぶす器具は109室にある）。

電池は109室流し横の段ボール箱に入れる。

一般的なごみ（生ごみ、可燃物、プラスチックを含む）は、実験室内のごみ箱に捨て、一杯になったらペールに集めておく。

2. 器具の取扱いと洗浄

器具の取扱い

個人専用器具（ピンセット、はさみなど）

卒業研究完了まで自分専用にかかる器具は各自が責任を持って管理し、自分の机などに保管する。

共通使用器具

実験で使用する器具は研究室共通で使用するものがほとんどである。

共通で使用する器具を使用したあとは、他の人が支障なく使えるように洗浄、乾燥、収納する。

洗い物

洗い (1) 手洗い

※ 洗うまでの置き場所： 使用し終えた器具は、流しの洗い桶に水道水を入れて、その中に全体を漬けておく。

※ 洗い物はその日の内に洗っておく。放置してある場合は翌朝に処分します。

※ 特殊な器具、（汚れがひどい場合など）特殊な洗い方を要するものや、同じ器具を次も使用したいなどの場合は、使用者の名前が分かるようにしておく。

※ 洗い始める前に、洗い、ゆすぎ、乾燥のための清潔な場所を十分に確保しておく。

器具を水道水（あるいはぬるま湯）で薄めた台所用洗剤につけて、ナイロンたわしやブラシを用いて外側から内部にかけて力をこめて 10～30 回こする。

洗った器具は直ちに洗い桶に入れた十分量の水道水中に移し、水を流しながら 15～30 分間置く。

口の小さな容器の内部には流水が通りにくいので、水道管を容器内に入れて内部に水が循環させる。

その後、流水を 20 回出し入れする。

腰高シャーレ、フラットシャーレはそのまま乾燥する。その他のものは蒸留水で 3 回すすいでから乾燥する。

すすいだ器具は斜めに置いたプラスチックかごに並べて自然乾燥する。

その際に、ホコリが内部に入らないように、すすぎの水がたまる部分がないように、他の器具と密着しないように、早く乾くように、配慮する。

乾燥したら直ちに決められた収納場所にしまう。

乾熱滅菌する器具は、111室の白い木箱に入れておく。

洗い (2) ピペット (メスピペット, パスツールピペット)

使用したピペットは水道水で汚れを落とした後、水道水を入れた容器の中につけておく。ある程度数がまとまったら、容器に入れて洗剤 (111室流しの塩ビ管中) に1晩漬ける。※洗剤は数ヶ月に1度新しく作り直す。

ピペット洗浄器で1晩すすぐ。

次に、ピペットすすぎ用の蒸留水 (109室流しの塩ビ管中) に合計8回 (蒸留水は一度取り替える) 通す。

ビニール手袋を着けてすすぎ終わったピペットを取り出し、水をよく切って金網筒 (111室オートクレーブ横) に先端を上にして並べ、恒温器 (109室ドラフト内) に入れて乾燥させる。

乾燥したピペットは、メスは111室実験台の引き出しに、パスツールピペットは缶容器に入れて (容器は109室実験台の上の棚に置いてある) 乾熱滅菌用の木箱に入れておく。

特殊な洗いもの

・電顕樹脂用器具

電顕樹脂は毒性が強い上に粘性が高いので専用のブラシ、スポンジ、洗い桶、乾燥かごを用いて洗う。

器具の収納場所

腰高シャーレ，フラットシャーレ，時計皿，デプレッションスライド

試験管（規格によって収納する部屋も異なる）

ねじロビン，コニカル遠沈管

注射筒，注射針

プラスチックシャーレ（丸），ミニカップ

三角フラスコ，試験管立て

半端のガラスシャーレ

メスピペット，薬さじ（大・中），（小）回転子，ガラスかくはん棒

プラスチックシャーレ（角）

メスシリンダー，ビーカー，乳鉢／乳棒，試薬ビン（ねじ口，共栓）

（ディスポーザブルの器具）

ろ紙，カートリッジ滅菌フィルタ

マイクロピペットチップ，エッペンドルフチューブ

3. 試薬や溶液の取扱い

<溶液の保管, 廃棄>

溶液を作成し公的な場所に保管する場合は, 内容, 作成日付, 作成者名をラベルに明記する。

試薬や溶液には, 特定の廃棄・廃液処理を施す必要があるものがある。

- ・写真廃液 (現像液, 定着液)
- ・クロム酸 (重クロム酸ナトリウム水溶液など)
- ・ウラン水溶液, 鉛水溶液
- ・樹脂
- ・有機溶媒 (※アルコール, アセトンなどは少量であれば多量の流水を流しながら排水溝へ流すこともできる。)

<抗体などの保管, 分注>

抗体などの高価な機能タンパク質を実験に用いる場合は, 変性させずに全量を効率よく使用できるように配慮する。

一般的にタンパク質の変性を避けるために配慮する事柄として次のような点が挙げられる。

- ・できるだけ低温で保存する。
- ・繰り返しの凍結／融解を避ける。
- ・高濃度で保存する。

購入した1本分全量を, 1回から数回の使用で使い切るような量に希釈せずに分注して, -80°C冷凍庫に保存する。

(小さい方 (0.5 mL) のエッペンチューブを用いる。ひとまとめにしてビニール袋などに入れて保管する。低温でも確認できるようなラベルを用いて内容物の情報を明示する。試薬リストに必要な事項を記入する)

蛍光標識されている抗体は遮光保存する。

<個人専用の溶液>

自分専用で用いる緩衝液も研究室全体で使用する場所 (棚や冷蔵庫など) に保管しても構わない。

公的な場所に保管する場合は, 内容, 作成日付, 作成者名をラベルに明記する。

4. 蒸留水作成と滅菌

<一次蒸留水の作成法>

- (1) 通常、沸騰容器の排出口はクランプとクリップで二重に閉じてある。
- (2) 排出口をあけ、容器内に溜まっていた水を排出する。
- (3) 排出し終わったあと、電熱線口から水道水を容器内に当て、沈着物を洗い流す。
- (4) 沈着物が排水口に詰まっていないことを確認し、排水口をクランプとクリップで閉める。
- (5) 水道水を容器半分ほどまで溜める。
- (6) 冷却水のコックを開け、適当な水量を流す。
- (7) 電熱線のシリコン栓を閉め、電熱線が水没し、途中で交差しないように調整する。
- (8) 電源を投入する。
- (9) 蒸留水が十分に溜まったら、電源を切り、冷却水を止める。

<二次蒸留水の作成法>

- (1) 冷却器を沸騰容器からはずし、容器の線（「7 hrs」）まで一次蒸留水を入れる。
（流しの横の容器から、あるいは最初に溜めるポリタンからでも可）
- (2) 電熱器に置き、冷却器を取り付ける。
- (3) 冷却水を適当に流す。
- (4) タイマーを7時間にセットしてコンセントに挿す。
- (5) 時間が経ってタイマーが切れたら、コンセントからタイマーを抜き、冷却水を止める。

5. 顕微鏡観察法

<顕微鏡の配置, レンズの割り当て, 部品の収納場所>

<蛍光顕微鏡>

特別な装置

(1) 励起光源

顕微鏡使用後は必ず電源を切る（光源の水銀ランプは寿命 200 時間（公称）で価格は 2 万円以上する）。

電源を切ったあと 30 分間は再度電源を投入しない。

(2) 光学フィルター

励起光フィルター, ダイクロイックミラー, 蛍光フィルターの 3 点セットが光路に組み込まれている。

観察すべき蛍光の波長によって, フィルターのセットを切り替えて使用する。

<顕微鏡の保守, 清掃>

顕微鏡を使用したあとは, 試料ステージが汚れていないかをよく確認する。

汚れている場合は, 直ちにキムワイプなどで清掃する。

塩溶液をつけた場合は, まず蒸留水で濡れ拭きしたあと, キムワイプなどで乾拭きする。

・油浸レンズの使用

100 倍の対物レンズなどは油浸して用いる。基本的に, 一度油浸で観察したプレパラートは油浸以外では使用できない。低倍の観察を済ませてから油浸観察に進む。

(1) カバーガラスが動かないように固定しておく。

(2) カバーガラスの観察領域に少量のオイルを置く。

※ オイルがカバーガラスの外にはみ出さないように注意する。

(3) 油浸の対物レンズをオイルに触れるまで静かに下ろす（ステージを上げる）。

※ レンズとオイルの間に気泡が入らないように気をつける。気泡ができたときはオイルをふき取ってやり直す。

(4) 顕微鏡で観察しながら試料に焦点が合うまで, ステージを上げる。

※ 試料を見逃さないように, 光路の中心に試料があることを事前に確認する。また, コンデンサ絞りを絞っておき, 焦点深度を深くしておく。

※ 油浸用プレパラートのオイルが他の対物レンズを汚さないように注意する。

※ 油浸用にオイルをつけたプレパラートは水平に保管する。

・対物レンズの清掃方法

油浸などにより対物レンズの先端が汚れたときには清掃する。

レンズ（ガラス）に触れるときには必ずレンズペーパー（Whatman）を用いる。

洗浄液（エタノール：エチルエーテル＝3：1の混液）をペーパーにしみこませ、油や汚れを拭き取ったあと、乾いたきれいなペーパーで乾拭きする。

対物レンズを顕微鏡からはずし、実体顕微鏡のステージに逆さに置いて、レンズ部分の汚れを観察することができる。観察しながらピンセットなどに巻きつけたペーパーで汚れを拭き取ることも可能。ピンセットの表面がレンズに接触しないように注意する。

6. 写真撮影と現像

顕微鏡写真は基本的に白黒で撮影し、現像、焼付けまで各自が行う。

<フィルムの準備>

Neopan F (ISO 感度 32), Neopan SS (ISO 感度 100), Tri-X (ISO 感度 400 ; 増感現像可能) の 3 種類の 35 mm フィルムが使用可能。

感度が高いと粒が荒くなる。被写体の性質に応じて適宜選択する。

(例 : 動かない試料の明視野観察→Neopan F, 微弱な蛍光試料→Tri-X (ISO800 に増感))

フィルムは長巻 (100 m) として供給され、種類ごとに専用の容器 (デイロール) に入っている。デイロールの中身が無くなったら、暗室で新しいフィルムを装填する。

長巻から必要コマ数 (36 コマ以内) のフィルムをパトローネに巻き取って撮影に用いる。

巻き取ったらフィルムの種類とコマ数が分かるようにしておく。特に何本か「巻きだめ」するときには後で分からなくならないように注意する。

<顕微鏡写真撮影>

カメラボックスにフィルムを装填して、写真撮影装置 (3 種類ある) を用いて撮影する。

写真の焦点は撮影装置の覗きの像で合わせる。事前に「二重線の十字」による視度調整をしておく。

明視野像は、フィルムの感度を正しく設定して自動で撮影する (測光範囲は視野全体)。

暗視野像 (蛍光など) は、測光範囲を絞って自動で、あるいは試料の明るさを考えて適当な露光時間を設定し手動で撮影する。一般的には 2-3 段の間隔で 3 通りの露光時間で撮影することが多い。

撮影時には必ずコマごとの撮影データ (撮影期日, 試料の特徴, 視野の場所, 撮影条件など) をノートに記入する。

撮影を終えたフィルムは完全に巻き戻したことを確認してカメラボックスから取り出し現像まで暗所に保管しておく。巻き戻しが上手く行ったか分からないときには、カメラボックスごと暗室に持ち込み、暗黒下でカメラボックスを開けて巻き戻しを確認し、フィルムを回収する。

<フィルムの現像>

現像, 定着液の作製

水道水を用いてよい。容量の計量はプラスチックのビーカーで可。
必要に応じてガラス攪拌棒（写真専用がある）や回転子を用いる。
焼付け用定着液以外はすべて冷蔵保存。

（保存溶液）

- ・ Neopan F 現像液 A 液
- ・ Neopan F 現像液 B 液
- ・ 万能定着液（2 倍保存液）

（使用液）

- ・ Neopan F 現像液
A 液 50 mL, B 液 50 mL に水を加えて 600 mL にする。4 回まで、作製当日だけ使用可。
- ・ 定着液
万能定着液を 1 倍に希釈して用いる。フィルム用と焼付け用で別の容器を用いている。
- ・ スーパープロドール
市販の粉を溶かして使用液とする。10 回まで使える。使用者は使用回数を容器に記入する。

現像

フィルムを暗黒下でベルト式現像タンク（35 mm 用；他サイズ用があるので注意する）に装填する。その際、フィルムの乳剤面（内側の面）に直接手を触れないように注意する。

タンクに装填したフィルムを実験室内に持ち帰り現像、定着を行う。

タンクの容量は 600 mL なので現像液、定着液があふれないように注意する

- ・ 現像液（2 種類のうちどちらか）注入、攪拌 → 所定の時間処理する。
- ・ 現像液排出

※ 排出に 15 から数十秒かかる。その時間は処理時間から差し引いておく。

- ・ 軽く水洗（必要ならば酢酸で停止処理を行う）
- ・ 定着液注入、攪拌 → 所定の時間処理する。
- ・ 定着液排出
- ・ 流水で所定の時間水洗（必要に応じて水洗促進剤を用いる）
- ・ 水洗の水にドライウエルを少量加えて攪拌後、吊るして伸ばして自然乾燥。
- ・ 乾燥後は、各自のフィルムアルバムに収納して撮影データを記入する。

焼付け

（省略）

7. ネットワークの利用

<パソコンの IP アドレス設定>

<プリンタの設定>