

臨床検査 Yearbook 2004

図説 臨床化学と遺伝子検査に 必要な基本技術と理論

全体目次

発刊にあたって	渡辺 直樹	巻頭
I. 分析技術の基本	細萱 茂実, 他	1
II. 試薬調製の基本—緩衝液の種類, 調製法, 使い分け—	山舘 周恒, 他	15
III. 酵素反応の基礎	大澤 進	25
IV. 遺伝子と蛋白概論	福本 誠二	37
V. 蛋白解析に必要な基本技術		
A. 電気泳動法		
1. 総論	山中 基子, 他	49
2. 電気泳動で用いられる染色法	芝 紀代子	57
3. 等電点電気泳動法	戸塚 実	69
4. SDS-PAGE とウェスタンブロッティング法(免疫沈降法)	辻 直樹, 他	80
5. パルスフィールドゲル電気泳動法(巨大分子 DNA の解析)	満田 年宏	98
B. カラムクロマトグラフィー		
1. 総論	高井 信治	108
2. イオン交換カラムクロマトグラフィー	金澤 秀子	113
C. 質量分析—臨床検査への応用—	清水 章	125
VI. 遺伝子解析に必要な基本技術		
A. DNA, RNA 抽出法と取り扱い上の注意点	宮地 勇人, 他	139
B. サザンブロッティング法とノザンブロッティング法	西岡 淳二, 他	149
C. 蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法	上平 憲, 他	162
D. 遺伝子増幅法—PCR とゲルによる解析	船渡 忠男, 他	170
E. 定量的遺伝子検出法		
1. Real-time PCR 法(TaqMan PCR, Light cycler)による遺伝子定量	横田 浩充	180
2. ハイブリダイゼーション法	行正 信康, 他	190
F. 制限酵素断片長多型(RFLP), マイクロサテライト(microsatellite)解析法	末広 寛, 他	200
G. Direct Sequence 法(PCR-SSCP, SNPs を含む)	糸賀 栄, 他	209
VII. 手のひらサイズの臨床分析デバイス	佐藤 記一, 他	221
索引		巻末

臨床検査 Yearbook 2004

図説 臨床化学と遺伝子検査に 必要な基本技術と理論

目 次

発刊にあたって.....渡辺 直樹...巻頭

I. 分析技術の基本

分析技術の基本.....	細萱 茂実, 他...	1
I. 化学分析の基本技術.....		1
A. 化学分析用器具.....		1
1. 質 量.....		3
2. 体 積.....		3
3. 温 度.....		3
B. 化学分析方法の種類.....		3
1. 重量分析.....		3
2. 容量分析.....		3
3. 機器分析.....		3
II. 吸光光度分析.....		4
A. 吸光光度分析装置.....		4
1. 装置の構成.....		4
2. 装置の性能表示.....		5
B. 定 量.....		6
1. 吸光度と透過率, 濃度の関係.....		6
2. 検量線法.....		6
3. 標準添加法.....		7
III. イオン電極法.....		7
A. 測定原理.....		7
B. 測定装置.....		8
1. 装置の概要.....		8
2. 電極の種類.....		8
IV. 免疫学的定量分析.....		8
A. 分析方法の種類.....		8
V. 自動分析装置.....		8
A. 装置の種類.....		8

B. 測定法の反応パターン	10
VI. 標準物質を用いた校正	10
A. 検量線が直線の場合	10
1. 基本的方法	11
2. 1点校正法	12
B. 検量曲線	14

II. 試薬調製の基本

試薬調製の基本－緩衝液の種類，調製法，使い分け－	山館 周恒，他...	15
I. 理論的背景		17
A. 緩衝液の基礎		17
1. 緩衝液とは		17
2. 緩衝能		17
3. イオン強度と活量係数		18
4. 温度・圧力・希釈・塩類添加と pH の関係		18
B. 目的に合った緩衝液の選択		19
1. 基質と緩衝液の二役		19
2. 試薬の安定性に配慮した緩衝液の利用例		19
II. 緩衝液の調製		20
A. 器具・機器類と脱イオン水		20
1. 器具・機器類		20
2. 試薬用純水		21
B. 具体的な調製例		21
1. 電気泳動用緩衝液		21
2. グッド緩衝液		21
3. 核酸実験用試薬		23
III. まとめ		23

III. 酵素反応の基礎

酵素反応の基礎	大澤 進...	25
I. 酵素反応速度論の基礎		25
A. 反応速度論		25
B. 化学反応速度		25
C. 化学平衡		26
D. Michaelis-Menten の式		26
E. 酵素活性測定の場合		26
F. Km 値		27
G. 基質濃度測定		27
II. 酵素活性測定のための基質濃度		27

III. Km 値の求め方	28
IV. 生体成分の酵素的測定法	29
V. 酵素的測定法の組み立て方	31
A. 試薬としての酵素の種類	31
B. 酵素の取り扱い方	31
C. 酵素の特性	31
VI. 酵素系の設計	32
A. 酵素量の計算	33
VII. 酵素共役反応	34
A. end point-rate 法	34
B. end point-end point 法	34
C. rate-rate 法	35
VIII. 酵素を活用した臨床化学分析	35

IV. 遺伝子と蛋白概論

遺伝子と蛋白概念	福本 誠二...	37
I. 遺伝と遺伝物質		37
II. 蛋白の構造		40
III. 遺伝子の構造と機能		42
IV. 産生蛋白の調節機序		45
V. 分子生物学の基礎		46
VI. 疾患の原因としての遺伝子異常		47

V. 蛋白解析に必要な基本技術

A. 電気泳動法		
1. 総論	山中 基子, 他...	49
I. 電気泳動法の歴史		50
II. 電気泳動法の基本的原理		51
A. アミノ酸と蛋白質の荷電		51
B. 電気泳動の移動度		52
III. 電気泳動の実際		53
A. 支持体の種類		53
B. 緩衝液の種類		54
C. 蛋白質解析を目的とした電気泳動法		55
1. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)		55
2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (polyacrylamide gel electrophoresis : PAGE)		56
3. 等電点電気泳動法 (isoelectric focusing : IEF)		56
4. 二次元電気泳動法 (2D-electrophoresis)		56
IV. まとめ		56

2. 電気泳動で用いられる染色法	芝 紀代子...	57
I. 目的.....		57
II. 理論的背景.....		58
A. 色素染色.....		58
1. 色素染色とは.....		58
2. 蛋白染色剤.....		58
B. 銀染色法.....		58
1. 銀染色とは.....		58
2. 銀染色法の原理.....		58
C. 方法.....		58
1. ボンソー 3R 染色.....		58
2. ボンソー S 染色.....		58
3. アミドブラック 10B 染色.....		60
4. ニグロシン染色.....		60
5. アシッドバイオレット 17 染色.....		60
6. クマシーブリリアントブルー R250 染色 (Coomassie Brilliant Blue, Reddish hue).....		60
7. クマシーブリリアントブルー G250 染色 (Coomassie Brilliant Blue, Greenish hue).....		61
8. 銀染色.....		61
D. 各種支持体に適切な蛋白染色法の選択.....		61
1. セ・ア膜.....		61
2. アガロース.....		65
3. SDS-ポリアクリルアミドゲル.....		66
3. 等電点電気泳動法	戸塚 実...	69
I. 目的.....		69
II. 理論的背景.....		70
III. 方法.....		71
A. 分取用等電点電気泳動法.....		71
B. ゲル等電点電気泳動法.....		71
1. スラブゲルの作成.....		72
2. 電極液.....		72
3. 通電.....		73
4. 操作法(市販スラブゲル用カセットを用いた場合の1例).....		73
5. 泳動後の処理.....		75
IV. 本法でどこまで解析できるか.....		76
V. 予期せぬ結果が出たとき, 何を考えるべきか.....		78
4. SDS-PAGE とウェスタンブロッティング法(免疫沈降法)	辻 直樹, 他...	80
I. 目的.....		80
II. 蛋白の抽出および可溶化.....		80
A. 方法.....		80

B. 蛋白濃度の測定	82
C. 蛋白溶液の取り扱いおよび保存法	83
III. SDS-PAGE	83
A. 試料の調整	83
1. SDS 処理	84
2. 還元剤による SH 基の保護	84
3. 加熱処理	85
B. ポリアクリルアミドゲルの作製	85
1. アクリルアミドの重合機序	85
2. ゲルの濃度と種類と選択	85
3. 濃縮ゲルによる蛋白の濃縮	86
C. 電気泳動における電力の設定	88
1. 定電圧	88
2. 定電流および定ワット数	88
D. スマイリング	88
E. 分子量マーカー	89
IV. ウェスタンブロッティング法	89
A. 転写膜の選択	89
B. 転写装置の選択	90
C. ブロッキング	92
D. 特異(一次)抗体の選択	92
E. 免疫複合体の検出	93
1. 酵素標識抗体法	93
2. ストレプトアビジン・ビオチン化酵素複合法	93
3. プロテイン G 法	94
4. 金コロイド標識抗体法	94
F. 目的蛋白の検出の実際	94
V. 免疫沈降法-ウェスタンブロッティング法	95
A. プロテイン A とプロテイン G の免疫グロブリンに対する結合力	95
B. 免疫沈降法の実際	95
5. パルスフィールドゲル電気泳動法(巨大分子 DNA の解析)	98
I. 目的	98
II. 理論的背景	99
III. 方法	101
IV. 本法でどこまで解析できるか	101
V. バンドに関するトラブルシューティング	103
B. カラムクロマトグラフィー	
1. 総論	108
I. HPLC	108

2. イオン交換カラムクロマトグラフィー	金澤 秀子... 113
I. 目的.....	113
II. 理論的背景.....	114
III. 方法.....	116
A. カラムの選択.....	116
1. 固定相の性質.....	116
2. イオン交換担体の種類.....	116
3. 分離モードの選択.....	117
B. カラムの作成方法.....	118
1. コンディショニング.....	118
2. 充填方法.....	118
C. 試料調製.....	118
1. 試料の調製.....	118
2. 試料負荷量.....	118
D. 分離条件の最適化.....	118
1. pH.....	118
2. 溶離液に用いる緩衝液.....	119
3. イオン強度.....	120
4. グラジエント溶出法.....	120
IV. 本法でどこまで解析できるのか.....	121
V. 予期せぬ結果が出たとき, 何を考えるべきか.....	123
1. 目的とする蛋白の分離が悪い.....	123
2. 蛋白の溶出力が弱い場合.....	123
3. 高速(迅速)分離をしたい.....	123
4. 蛋白の変性(沈澱)が起こる.....	124
5. 試料がカラムに吸着されない.....	124
6. 分離に再現性がない.....	124
C. 質量分析ー臨床検査への応用ー	清水 章... 125
I. 目的.....	125
II. 理論的背景.....	125
III. 方法.....	126
A. イオン化法.....	126
1. 電子イオン化法(電子衝撃法).....	126
2. マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 MALDI(マルデイ).....	126
3. エレクトロスプレー・イオン化法.....	127
B. イオン化分子の分離法.....	127
C. プロテオーム ; 二次元電気泳動のスポット内の蛋白質の同定.....	129
IV. 本法でどこまで解析できるのかー応用例ー.....	130
A. 質量分析による異常ヘモグロビン構造決定.....	130
B. アミロイドーシスを起こすトランスサイレチン変異の検出.....	133

C. トランスサイレチン修飾構造異常の検出	134
D. HbA1c の測定	135
E. 硝子体蛋白質のプロテオーム	135
F. 培養ヒト肺癌細胞蛋白質のプロテオーム	136
V. 予期せぬ結果が出たとき、何を考えるべきか	137

VI. 遺伝子解析に必要な基本技術

A. DNA, RNA 抽出法と取り扱い上の注意点	宮地 勇人, 他...	139
I. 目的		139
II. 理論的背景		140
A. 高分子 DNA(ヒトゲノム)		140
1. 検体の取り扱い		140
2. 抽出		141
B. RNA		142
1. 検体の取り扱い		142
2. 抽出		142
C. 臨床検体からの病原体 DNA/RNA 抽出		144
III. 方法		145
A. 高分子 DNA 抽出		145
1. 試薬		145
2. 操作手順		145
B. RNA 抽出 : APGC 法		145
1. 試薬		145
2. 操作手順		145
C. RNA 抽出 : 一段階式の RNA 抽出キット (APGC 法)		146
1. 試薬		146
2. 操作手順		146
IV. どこまで解析できるのか		146
A. DNA 抽出		146
B. RNA 抽出		146
V. 予期せぬ結果が出たとき、何を考えるべきか		147
A. DNA(プロテアーゼ K/フェノール・クロロホルム抽出法)		147
1. 低収量		147
2. 低い精製度		147
3. DNA の分解		147
B. RNA 抽出 (APGC 法)		147
1. 低収量		147
2. 低い精製度		147
3. RNA の分解		147

B. サザンブロッティング法とノザンブロッティング法	西岡 淳二, 他...	149
I. サザンブロッティング法.....		149
A. 目的.....		149
B. 理論的背景.....		149
C. 方法.....		150
1. 制限酵素による DNA の断片化.....		150
2. アガロース電気泳動.....		152
3. メンブランへのトランスファー.....		153
4. ハイブリダイゼーション.....		154
5. プローブ DNA の作製.....		156
6. 本法でどこまで解析できるのか.....		156
II. ノザンブロッティング法.....		157
A. 目的.....		157
B. 理論的背景.....		157
C. 方法.....		157
1. RNA 試料.....		157
2. アガロース電気泳動.....		157
3. メンブランへのトランスファー.....		160
4. ハイブリダイゼーション.....		160
D. 本法でどこまで解析できるのか.....		161
C. 蛍光 <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法	上平 憲, 他...	162
I. 検査目的.....		162
II. FISH 法の特徴.....		163
III. FISH 法の基本原理と標準的な手技.....		163
A. 検査材料.....		163
B. DNA プローブ.....		163
C. 標準的な手技.....		165
D. 蛍光シグナルの観察.....		165
IV. 造血器腫瘍における FISH の臨床応用.....		167
A. 急性リンパ性白血病(ALL).....		168
B. 骨髄性増殖性疾患.....		168
C. 慢性リンパ性白血病(CLL).....		168
D. 悪性リンパ腫(ML).....		168
V. 本法でどこまで解析できるか.....		168
VI. 予期せぬ結果が出たとき, どう考えるか.....		169
D. 遺伝子増幅法—PCR とゲルによる解析	船渡 忠男, 他...	170
I. 目的.....		170
II. 理論的背景(PCR 法の原理).....		170
A. 熱変性.....		171

B. アニーリング	171
C. 伸長反応	172
D. 増幅反応	172
E. RT (reverse transcription)-PCR 法	173
F. Long-PCR 法	174
G. ゲル電気泳動法	174
III. 方法	175
A. 準備	175
B. PCR	175
C. RT-PCR	175
D. ゲル電気泳動	176
IV. 本法でどこまで解析できるのか	176
A. サイクルシーケンス法	176
B. 遺伝子変異解析	176
C. <i>In situ</i> PCR 法	176
D. PCR フィンガープリント法	176
V. 予期せぬ結果が出たとき、何を考えるべきか	177
A. 非特異バンドの出現	177
B. PCR 産物が得られない場合	178
C. ミスプライミング	178
D. コンタミネーション	178

E. 定量的遺伝子検出法

1. Real-time PCR 法 (TaqMan PCR, Light cycler) による遺伝子定量	横田 浩充	180
I. 目的		180
A. Real-time PCR 法について		181
B. TaqMan PCR システムによる遺伝子定量		181
1. TaqMan probe による蛍光検出		181
2. TaqMan PCR システムについて		182
C. Light cycler による遺伝子定量		183
1. Light cycler の特徴		183
2. LightCycler で使用される主な蛍光検出系		184
3. LightCycler の融解特性分析		185
D. Real-time PCR 条件設定		185
1. プライマー, Probe の設計		185
2. Tm 値		187
3. 反応条件		187
E. 注意点		187
1. Plasmid standard に関して		187
2. 内部コントロールによる補正		187
3. PCR 遺伝子検査の限界		187

4. プライマーの設計に当たって	188
5. 精度管理に当たって	188
2. ハイブリダイゼーション法	行正 信康, 他... 190
I. 理論的背景	190
A. 核酸(DNA)の構造と相補性	190
B. ハイブリダイゼーション(hybridization)	192
II. 核酸プローブの標識法	192
A. 2本鎖DNAプローブ	192
1. ランダムプライマー法	192
2. ニックトランスレーション法	193
B. 末端標識オリゴヌクレオチド	193
1. T4ポリヌクレオチドキナーゼによる5'末端標識	193
2. T4 DNAポリメラーゼによる3'末端標識	193
C. RNAプローブ	193
D. 非ラジオアイソトープ標識	195
III. ハイブリダイゼーションの影響因子	195
1. 温度	195
2. 塩濃度	196
3. 核酸塩基長と核酸濃度	196
IV. ハイブリダイゼーションの応用	196
V. DNAマイクロアレイ法	197
A. Gene Chip Technology (Affymetrix方式)	198
B. スポット型アレイ (Stanford方式)	198
F. 制限酵素断片長多型(restriction enzyme fragment length polymorphism, RFLP), マイクロサテライト(microsatellite)解析法	末広 寛, 他... 200
I. PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism, 制限酵素切断断片長多型)	200
A. 目的	200
B. 理論的背景	200
C. 方法	201
1. 器具	201
2. 試薬	201
3. 試薬の調整	201
4. アガロースゲル	201
D. プロトコール	202
1. PCR	202
2. 電気泳動	202
3. 制限酵素による切断	202
4. 電気泳動	202
E. 本法でどこまで解析できるのか	202

F. 予期せぬ結果がでたとき, 何を考えるべきか	202
II. マイクロサテライト解析	203
A. 目的	203
B. 理論的背景	203
C. 方法	205
1. PCR	205
D. 本法でどこまで解析できるか	207
E. 予期せぬ結果がでたとき, 何を考えるべきか	207
G. Direct Sequence 法 (PCR-SSCP, SNPs を含む)	糸賀 栄, 他... 209
I. DNA シーケンサーを用いた Direct Sequence 法	209
A. 目的	209
B. 理論的背景	209
1. ダイデオキシ法	211
2. サイクルシーケンス反応	211
3. 蛍光 DNA シーケンサーによるキャピラリー電気泳動法	211
C. 方法	211
1. 機器・試薬の準備	211
2. Sequencing 操作手順	211
D. 本法でどこまで解析できるのか	214
1. どこまで判読できるか	214
2. 変異部位の見分け方	214
E. トラブルシューティング	214
1. シグナルが非常に弱い	214
2. シグナルの先頭に大きなピークが出現する	214
3. 非常に大きなシグナルが複数出現する	215
II. DNA シーケンサーを用いた蛍光 PCR-SSCP 法	215
A. 目的	215
B. 理論的背景	215
C. 方法	217
1. 蛍光 PCR-SSCP 法	217
2. 塩基置換部位の確認	217
D. 本法でどこまで解析できるのか	218
III. DNA シーケンサーを用いた SNPs 解析法 (ALDH2 遺伝子型を例として)	218
A. 目的	218
B. 理論的背景	218
1. 蛍光 PCR-SSCP 法	218
2. SNaPshot™ 法 (プライマー伸長法)	218
C. 方法	218
1. 蛍光 PCR-SSCP 法	218
2. SNaPshot™ 法	218

D. まとめ..... 219

VII. 手のひらサイズの臨床分析デバイス

手のひらサイズの臨床分析デバイス.....佐藤 記一, 他... 221

 I. 目的..... 221

 II. 理論的背景..... 222

 III. 具体例..... 223

 A. イムノアッセイの集積化..... 223

 1. 背景..... 223

 2. イムノアッセイチップの作製..... 223

 3. マイクロチップイムノアッセイ法..... 223

 4. 実試料を用いた大腸癌の血清診断..... 225

 B. 細胞実験システムの集積化..... 225

 1. 背景..... 225

 2. マイクロチップにおける細胞培養..... 226

 3. マイクロバイオアッセイシステム..... 227

索引..... 巻末