**Alkaline Phosphatase Activityの測定練習（台湾海洋大 張研）**

**－異なるP条件下で2種の植物プランクトンの増殖期培養株を用いた場合－**

**文責：山口・梅澤**

**【人工海水(ASW)の作成】**

**1200mlのミリＱ水に対して下記の試薬を添加する**

H3BO3 0.015g

CaCl2 1.332g

MgCl2 2.285g

MgSO4 2.89g

KBr 0.243g

KCl 0.859g

NaHCO3 0.202g

NaCl 28.051g

＊ 少量では秤量しづらいので、10L程度を一度に作成するのが良い。

＊ 使用するプラスチックボトルやガラス器具等は、バクテリアの混雑を最小限にするために、あらかじめ121℃でオートクレーブにかけておく。

＊ ミリQに上記の元素を添加後、同様にオートクレーブをかける。スターラーで撹拌しながら行うとよい。

**前培養を行う**

**【 初期培地の作成 】**

＊植物プランクトンを、いきなり環境が大きく異なる2L程度の培養液で増殖させると、うまく増殖しないため、先ずは、環境の類似した小さな容積の培地で増殖を行った後に、本培養に入る。

1. オートクレーブ後に0.2µmメッシュで、100mgHgでろ過を行った人工海水を１Lずつデュラン瓶に分注する。

2. P-enrichedの条件（PO4 = 36.3 M）と、P-depletedの条件（PO4 = 1 M）を作成するために、1Lの人工海水に対して、1 mlを添加すればf/2培地を作ることができるようなstock solutionを、(<http://marine.rutgers.edu/ebme/html_docs/f2-MediaRecipes.htm>)を参考にしてく作成しておく。ビタミン類は、エッペンドルフチューブに入れて、冷凍保存しておくとよい。

3. stock solutionを、1.の人工海水に入れる。（P-depletedの条件では、1/36.3の添加）

4. 三角フラスコを4つ用意し、培養している珪藻（*Skeletonema* sp.）とシアノバクテリア（*Synechococcus* sp.）を、1 mlずつ、P-enrichedと、P-depletedの培地に入れる。

＊植物プランクトンの培養は、150 E/m2/sの光量で、12h:12hで行っている。

＊それぞれ培養を開始させ、増殖に合わせて2日間隔でAPA活性の有無を見る。

＊本来ならばP richではAPA活性は見られず、Low P条件では見られるはずである。

＊オートクレーブをかけた人工海水の冷却のために１晩おく。

**【 検量線の作成 】**

1. 0.5 mg/ ml で冷凍庫に保存してある3-o-methylfluorescein（Pなし）を1000倍希釈する。準備は14ml 遠沈管3本、50mlの遠沈管7本。

2. 14ml遠沈管の2本には0.05N NaOHを9ml 入れ（溶液をアルカリ性にするため）、残りの1本にはミリQを9ml入れる。50ml遠沈管にはミリQを27ml入れたものを1本（No.1）、15ml入れたものを6（No.2-No.7）本準備する。

3. 最初は0.05N NaOHの方に1ml入れて10倍希釈し、そこからさらにもう一本の0.05N NaOHに1ml入れて、初期濃度から100倍希釈する。

4. ミリQの方でも同じように行い、初期濃度の1000倍希釈にする。

5. 更に、チューブから3mlとり、27ml ミリQが入っている遠沈管に入れる。この時点で基質濃度は50×10-3 µg/ mlとなる。

6. 30mlとなった遠沈管から15mlをとりNo.2に入れ、2倍希釈を行う。そして次にはNo.2からNo.3に15mlを分注していき、同じ作業をNo.7まで行う。（この時点で、BlankとしてのミリQを加えて、0、0.78125、1.5625、3.125、6.25、12.5、25、50 ( x 10-3 µg/ ml)の3-o-methylfluorescein溶液が完成していることになる。この他に、100、場合に応じて500のものも用意しておくとよい）。

7. No.1からNo.7までそろえば、今度はそれぞれディスポーザルキュベット（10% 塩酸洗浄＋*オートクレーブ済み*）に4mlずつ分注していく（n=3）、このときミリQ（n=3）もBlankとして作っておく。

8. それぞれの標準試料をターナー蛍光光度計で測定し、蛍光値を調べ、検量線を作成する。この時のターナー蛍光光度計の励起波長は475nm、検出する蛍光波長515nmで行う。

9. 得られた値は、フォーマットファイル（APA standard）に代入して検量線（回帰式）を作成する。

**【植物プランクトンの固定と計数】**

* 植物プランクトンが順調に増えているかどうか、また、培養の初期条件を作成するための初期添加量を決定するため（経験則によると*Skeletonema* sp.と*Synechococcus* sp.それぞれの増殖期の最大飽和濃度は105、107であるので、その1/100程度の濃度を初期培養条件とする必要がある）植物プランクトンの細胞数を計数して確認する。

*Skeletonema* sp.の処理手順１

1. ルゴール溶液の*原液*を、エッペンドルフチューブの壁面に１滴付着させて、そこに*Skeletonema* sp.試料を1ml添加して固定する。

＊*Skeletonema* sp.の鎖は切れやすいため、フラスコから採取するときはあまり強く振らない方がいい。

＊ルゴールで固定した*Skeletonema* sp.の試料は常温で1カ月は保存しても問題ない。

＊計数用試料は、高濃度の場合（105を超えた辺り）は、14mlの遠沈管を用いて10倍希釈にする（Max 10倍）。

*Synechococcus* sp.の処理手順１

＊*Synechococcus* sp.は、小さすぎて液中では計数できないため、自家蛍光を見て計数を行う。

1. *Synechococcus* sp.の培養試料は、通常、10～100倍（最大1000倍）希釈をしたものを用いる。14mlの遠沈管を2本準備し、ACW 9mlを入れておく、培養サンプル1mlを1本目に入れて10倍希釈をし、続けて2本目で100倍希釈をする。（ただし、１視野辺りの個体数が20～30個体にならず、一桁の場合は、10倍希釈した試料を用いて、下記の操作を行う。）

この時、チップの中に植物プランクトンが残っている可能性もあるので、希釈先のASWで2回ほどチップの中も洗う。

2. フィルターフォルダの上に25mmのGF/Fフィルターをセットし、その上にNucleporeフィルター（PC: 0.2µM、25mm）を皺・気泡が出来ないようにセットする。上から、10～1000倍に希釈した*Synechococcus* sp.の培養試料を1 ml添加する。

＊薄いメンブレンフィルターを直接に載せると、フィルターを傷つけたり、密着性が悪くリークしたりする可能性がある。ろ過するときは100mmHg以下で吸引を行う。

＊濾過後、ガラス器具は速やかに洗浄する（70%エタノールを吹きかけ、水道水洗浄）。

2. プレパラートの準備を行う。プレパラート1枚には、P richとLow Pのフィルターをセットする。プレパラートに2か所オイルを1滴垂らし、ろ過したフィルターをセットする。2枚をセットしたら、2枚の間にオイルを1滴垂らし、カバーガラスを乗せる。

(*ここまで実験室で済ませ、張先生の部屋に行く。*)

＊プレパラートに作成した*Synechococcus* sp.試料は、冷蔵であれば数日なら保存できる。

3. ルゴールで固定しておいた*Skeletonema* sp.のサンプルをプレパラートに移す。ここにカバーガラスを乗せた状態で、隙間からピペットを使ってサンプルを注入する。カバーガラスとプレパラートの間をサンプルは自然と流れていく。

＊サンプルを注入直後は、*Skeletonema* sp.が浮いたり沈んだり動いているので、焦点深度を一定にするために、数分間は静置しておく。

＊プレパラートの枠の中には、1mlが入るらしいが、少し隙間ができる。

*Skeletonema* sp.の計数

1. *Skeletonema* sp.の計数時は、対物レンズは×10を使う。

2. 微量調整用のレボルバーを回して（時計回りに回すと近づく）、焦点をメンブランフィルターに合わせる。下からの光を調整する。

3. プレパラートを縦に5列見ていく。このときは通常のランプを使う。上から下へ移動してく間に、どれだけの*Skeletonema* sp.がスケールバー内を通るかをカウントする。このとき、左端と右端のどちらかを有効とするかをあらかじめ決めておく。たとえば、左端を有効とした場合、左端に触れるものも1個体とするが、右端に触れるものはカウントしないようにする。

4. 5列分を調べ終わると、次は1チェーンあたりの細胞数を調べる。これはプレパラートを横に移動させるときにスケールバーと接触する10個体について、1チェーンあたりの細胞数をカウントしていく。

5. 計数が終わったら、プレパラートは水道水で洗って机に置いておく。サンプルも流しに捨てる。

*Synechococcus* sp. の計数

1. 青色光（ブルーランプ）で励起させて計数を行う。

2. *Synechococcus* sp.の計数時は、油浸対物レンズは×100を使う（オイルを1滴ずつ滴下する）。

3. 焦点を合わせるときは、下からの光を基に近づけながら、フィルターの表面にピントを合わせる。

4. ピントが合えば、下からの光は段ボールでさえぎる。

5. 計数はフィルターを横方向に10視野、縦方向に10視野分行う。分裂途中の細胞も中には見られるが、それを1細胞とするか2細胞とするかは個人の判断となる。しかしながら、判断は全サンプルで統一すること。

6. 計数が終わったら、プレパラートは専用の容器に廃棄する。

7. キムワイプ紙の内側（なめらかな方）で、手でこすることなく、紙をあてる感じで対物レンズを掃除する。

8. 光量つまみを回して最小にして、電源を落とす（2か所）

＊得られたデータは、次ページの計算方法に従って、細胞数に直す。

【本培養の開始】

＊培養開始2日目までの小さい培養瓶から、大きい培養瓶（2L）に移す場合は、初期濃度は、最終的な到達濃度の1/100くらいに合わせるのが望ましい。最終到達濃度は、*Synechococcus* sp.の場合は、107のオーダー、*Skeletonema* sp. の場合は、105のオーダーであることが経験的には知られているため、計数ファイル（日付cells）内の細胞数（黄色のセル）を参考に、人工海水への試料添加量を決定する（2012年1月の実習では、*Skeletonema* sp.は20倍希釈、*Synechococcus* sp.は、今回は細胞数が少なかったので3倍希釈として培養量を減らした）。

*Skeletonema* sp.の本培養

1.人工海水1900mlをフラスコに入れる。

＊バクテリアの混入を避けるために、ASWの蛇口の先端をアルコールランプで殺菌する。このとき蓋のアルミも軽くあぶっておく。

＊採取するときなどに*Skeletonema* sp. が沈殿することを避けるためにスターラーを入れ、採取時などに撹拌を行う。あまり強く撹拌を行うと細胞鎖が切れるので気を付ける。

2. 前培養の培地から25mlのピペットを使い100ml入れて、2000mlとした。

＊ピペットはサンプルごとに変える。

*Synechococcus* sp. の本培養

500mlの三角フラスコを用いた。今回は、前培養の細胞数が少なかったので、3倍希釈を行った。すなわちASW200mlに前培養液を100ml加えた。

【*Skeletonema* sp. の場合の細胞数の計算方法】

X = N x n x (W/Ls) (cells/ml)

N: スライド上で観察した長方形枠内での細胞数の平均値

n:　横移動で確認した20個体の細胞数の平均値

W:　スライドガラスの試料設置部分の長方形の幅（張Labでは、50 mm）

Ls: レンズのルーラーの幅（張Labでは、0.8 mm）

【*Synechococcus* sp.の場合の細胞数Xの計算方法】

X =N x (A2/a2) x (1/v) (cells/ml)

N: 20視野辺りの平均細胞数

A:フィルターの濾過面積（張Labでは、16 mmφ）

a: 顕微鏡の視野面積（張Labでは、140 mφ）

v: 濾過量　（張Labでは、1ml）

\*実際の濃度は、上記の計算の後に、最後の希釈率Yを乗じて、X×Y（cell/ml）となる。

細胞増殖に合わせて、本培養の細胞数とAPA活性を二日おきに測定していく。

【アルカリフォスファターゼ活性（APA）の測定】

培地中に溶存しているAPが反応する可能性があることと、DOPが存在するとP蛍光基質の反応を阻害することから、直接培地のAPAを測定するのではなく、植物プランクトンをフィルター上にろ過後、ASWで洗浄を行い、ASWで植物プランクトンのみを再懸濁させた試料溶液のAPAを測定する。これにより純粋に植物プランクトンで発現しているAPAを測定することができる。

1. マニフォールドを準備し、47mmのポリカーボネートフィルターをセットする。この時、*Skeletonema* sp.は5µm、*Synechococcus* sp. が0.8µm目合いのポリカーボネートフィルターを使用する。この時、粗面（容器に収納された状態で上側）を上にして用いる（経験上この方がより懸濁しやすいらしい）。
2. それぞれの本培養のフラスコから25mlピペットを用いてサンプルを採取し、重力濾過を行う。

（今回は*Skeletonema* sp.が50ml、*Synechococcus* sp.は15mlを採取した）

1. 一度ろ過を行ったあとにASWにより洗浄を行う（今回は*Skeletonema* sp.で50ml、*Synechococcus* sp.で25mlを使用）。この作業により、フィルターと植物プランクトンに残っている培地を洗い落とす。重力濾過の際に引きが悪い場合は、ハンドポンプをもちいてもよい。ただし、圧力は10mmHg以下で行う。
2. 洗浄後、再びフィルターをASWを入れたビーカーに浸し再懸濁させる。培地中と同じ植物プランクトン濃度にする。

（今回は、*Skeletonema* sp.で50ml、*Synechococcus* sp.で15mlのASWにフィルターを浸した）

＊濾過時や再懸濁時にロスがあり、細胞数が元の培地中の細胞数と異なっている可能性が高い。そのため、この作業に際して、どのくらいの細胞数のロスがあるか、何回か知見を集めておくとよい。

＊残った溶液のChl.a濃度を測定しておくと、APAをChl.a量で標準化できる。

5.　しっかりと懸濁させたあと、それぞれのビーカーから4mlを採取し、キュベット3本に注入していく。

2. -20℃で保存されている3-o-methylfluorescein Phosphate入りのバッファーを0.5ml入れる。この時、ピペットマンを押す力が弱いと全体が混合されないので、ある程度勢いをつけて入れる。（プランクトンにダメージを与えないように）

3. APAが存在すると入れた直後から反応が始まるので、バッファーを入れるとすぐにターナーで蛍光値を計っていく。これが0minになる。（実際はきっちり30分での反応速度が得られればいいので、あまり焦らないで行う）

4. 全試料の蛍光値を計った後、25度、暗条件の培養器に静置して30分間反応させた後、再び蛍光値を測定する。

5. APA calculationファイルに数値を入力して細胞数辺りのAPA活性を求める。Chl.a濃度での標準化でも良い。

＊余った3-o-methylfluorescein Phosphate入りのバッファーは-20℃で冷凍保存して再利用するが、一連の実験では同じバッチを使用するようにする。

【3-o-methylfluorescein Phosphateの作成方法】

1. SIGMAのカタログを参照して、2.21gのTrizma HClと4.36g/LのTrizma baseを1LのミリQに溶解させて、pH=8.5のTrizma bufferを作成する。0.2 Mフィルターで濾過後、50 mlずつ遠沈管に分注して冷蔵保存。

2. 250 mgの3-o-methylfluorescein Phosphateを1LのpH=8.5のTrizma bufferに溶解させ(濃度が合っていれば溶媒量は異なってもよい)、0.5 mlずつエッペンドルフチューブに分注して、-20℃の冷凍庫で保存する。

3. 使用時に、250mg/Lの3-o-methylfluorescein Phosphateの0.5 mlを室温に戻し、冷蔵庫に保存しているpH=8.5のTrizma bufferに加えて、使用3-o-methylfluorescein Phosphateを作成する。

　＊試薬を解凍する時は室温以上にしないように気をつける。遠心分離機を使っても良い。

ちなみに0.5 mg/ mlの3-o-methylfluoresceinは99％のメタノールを用いて作成する。作成後は冷凍保存する。