

■課題 1

大腸菌のラクトースオペロン・トリプトファンオペロンでは、今回の実験で用いた β ガラクトシダーゼをコードする遺伝子 lacZ などが含まれている。通常は、これらの遺伝子の手前にあるプロモーター領域にリプレッサーと呼ばれる阻害因子が結合している。このリプレッサーにより、RNA ポリメラーゼによる転写が阻害されるため、通常は lacZ などの遺伝子は発現しない。これが負の調節機構である。

今回用いた IPTG はリプレッサーと親和性が高いため、これを用いてリプレッサーを取り除くことができる。よって RNA ポリメラーゼが結合可能となり、lacZ によってコードされる β ガラクトシダーゼが合成される。これが IPTG によるタンパク質発現誘導である。

■課題 2

β ガラクトシダーゼは本来、ラクトース (図 1) をグルコース (図 2) とガラクトース (図 3) に分解する反応を触媒する。これは、分子中のグリコシド結合を加水分解して切断する反応である。

ONPG (図 4) はガラクトースと O-ニトロフェノールがグリコシド結合した物質であり、酵素により分解すると黄色の o-ニトロフェノールが産生する。この呈色により β ガラクトシダーゼの活性を測定する。

■課題 3

泳動により見られたバンドのうち、求めるタンパク質の周辺のゲルを取り、ゲルの成分とタンパク質を分離する。泳動によりタンパク質は分離するため、あるバンドには同じ種類のタンパク質が集まっている。この部分のみを取り出すことで他のタンパク質の汚染の少ない、高純度のタンパク質を得ることが可能である。

■課題 4

<https://ruo.mbl.co.jp/bio/support/method/sds-page.html> SDS-PAGE は、分離用ゲルにポリアクリルアミド (PAGE), タンパク質の変性に SDS を用いる泳動法である。

タンパク質は等電点以外の pH では正または負の電荷を持っており、この状態で電圧をかけることでタンパク質を電極に引き寄せることができる。この性質を利用したものが電気泳動である。

電気泳動では、網目状のゲル内での移動距離が分子量と相関を持つことを利用してタンパク質を分離する。これは、分子量が大きいタンパク質はゲルの網目に絡まって移動距離が短くなり、逆に分子量が小さいタンパク質はゲルをすり抜けて移動距離が長くなるという関係であり、タンパク質分子が直鎖状である時のみ成立する。しかしタンパク質は、ジスルフィド結合や静電的相互作用などにより折り畳まれた高次構造を持っているため、泳動に適さない。

よって、負電荷を持つ界面活性剤である SDS をタンパク質表面の正電荷と結合させることで静電的相互作用を阻害し、タンパク質を直鎖状にして泳動を行うことでタンパク質の分子量を得ることができる。これが SDS-PAGE である。

SDS-PAGE では SDS によるタンパク質の変性を伴うが、変性を伴わない泳動法には以下のようなものがある。

- Native-PAGE 法

ポリアクリルアミドゲルを用い、SDS による変性を行わずに泳動する方法である。タンパク質の立体構造が保たれるため、正確な分子量の測定には適さないが、目的のタンパク質のみを染色、標識すること

で分離することが可能である。

- 等電点分離法

pH 勾配のあるゲル中で電気泳動を行う方法である。先述の通り、タンパク質は等電点では電荷を持たず、電場の影響を受けずに静止する。等電点はタンパク質により異なるため、静止した位置によりタンパク質を測定することができる。

2. 実験方法

■試薬

- 滅菌水

培養液

- 100mM IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside)

LB 培地 * polypeptone 10[g] * Yeast extract 5.0[g] * NaCl 10.0[g] ##### SDS-PAGE 関連試薬 {#sds-page 関連試薬 }

- 分子量マーカー

《SDS-PAGE running buffer》* SDS(Sodium dodecyl sulfate) 1.0[g] * Tris 3.0[g] * Glycine 14.4[g]

《CBB 染色液》

- CBB 5.0[g]
- Methanol 100[mL]
- Acetic Acid 10[mL]

《SDS-PAGE sample buffer》

- SDS 0.40[g]
- 0.5M Tris-HCl 2.0[mL]
- 1M Dithiothreitol(DTT) 2.0[mL]
- Coomassie brilliant blue(CBB) 20.0[mg]
- Glycerol 2.0[g]

《CBB 脱色液》

- Methanol 10[mL]
- Acetic acid 14[mL]
- 30%(w/v)Acrylamide
- Acrylamide 75.0[g]
- N,N'-Methylenebisacrylamide 2.0[g]

《分離ゲル (8%)》

- 30 % (w/v)Acrylamide 2.4[mL]

- 1.5M Tris-HCl 2.25[mL]
- 10%(w/v) SDS 90[μL]
- H₂O 4.17[mL]
- TEMED 7.5[μL]
- APS 75[μL]

《濃縮ゲル (5%)》

- 30 % (w/v) Acrylamide 415[μL]
- 0.5M Tris-HCl 625[μL]
- 10%(w/v) SDS 25[μL]
- H₂O 1.4[mL]
- TEMED 2.5[μL]
- APS 25[μL]

βガラクトシダーゼ活性測定試薬

- 1M Na₂CO₃
- 0.4%(w/v) ONPG

《Z - Buffer(pH 7.0)》

- 0.2M Na₂HPO₄ 300[mL]
- 0.2M NaH₂PO₄ 200[mL]
- 1M KCl 10[mL]
- 1M MgSO₄ 1.0[mL]
- 1M DTT 1[mL]
- Chloroform 50[mL]
- 10%(w/v) SDS 10[mL]