

# 細胞情報学教室

10191043 鈴木健一

## 大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質の精製

### 目的

タンパク質精製手法のうち最も汎用されている大腸菌を利用した GTS 融合タンパク質の精製を行い、その手法と原理を学ぶ。

### 実験方法

実習書に基づき TA の指示にしたがって実験を行った。今回実習に我々の班が用いたタンパク質は A と C の 2 つである。また切断に用いる制限酵素のペアは「EcoR V・Not I」と「EcoR I・Xho I」である。

### 結果・考察

A と C の SDS-PAGE の結果は以下のようになった。

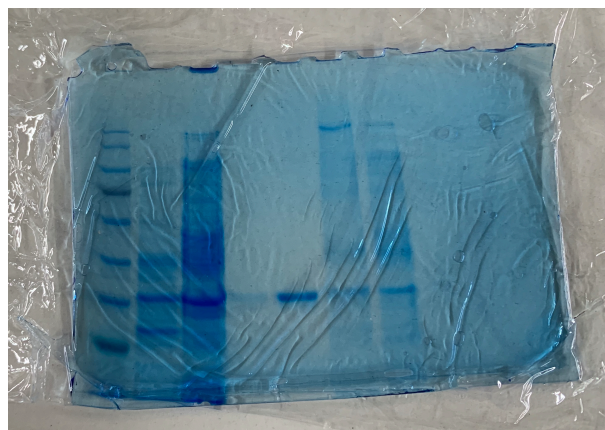


図1 SDS-PAGE A

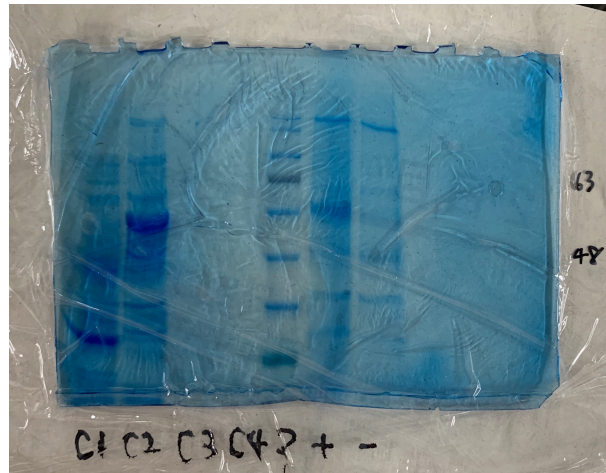


図2 SDS-PAGE C

それぞれの GST 融合タンパク質の塩基対の数を  $k$  としたとき、SDS-PAGE に現れるバンドの位置  $t$  kDa は以下のようにして求められる。

$$t = \frac{k}{25} + 26$$

したがって mASK1 CT のバンドの位置は 78 付近に、DASK1 NT のバンドの位置は 63 付近に現れると考えられる。hTrx は途中で終始コドンがコードされるため、翻訳されるタンパク質の大きさは 38 程度になると考えられる。

画像を参照すると A は 38 付近にバンドが現れていることから、A が hTrx であると判別される。

C は 48 と 63 の位置に強いバンドが現れている。1 番左のレーンは大腸菌を破碎した後の上清であり、2 番目はその沈殿である。本来は 2 番目ではなく、3・4 番目により強いバンドが現れるはずだったが、攪拌などの操作が足りなかったので 2 番目にバンドが出たと考えられる。C は 63kDa のバンドをもとにして DASK1 NT であると判別された。

続いて DNA の電気泳動の結果である。

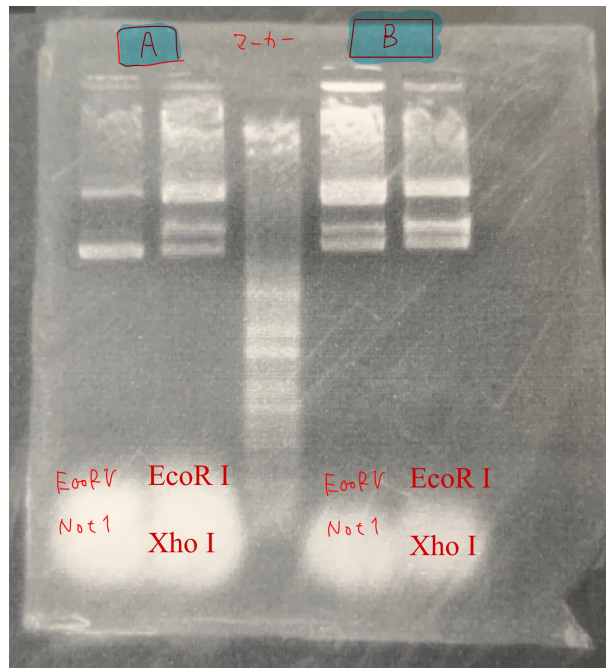


図3 DNAの電気泳動

画像を見ると1600bp以下のバンドがタンパク質A・Cの両方でどちらの制限酵素を用いても現れなかった。このことから、DNAの抽出まではできているが、その後で制限酵素が全く作用しなかったと推測される。ピペティングや制限酵素を付与する際の操作に不備があったと思われる。

電気泳動の結果からは全くタンパク質の判別ができなかったため、SDS-PAGEの結果から本来は何本のバンドが生じていたかを記述する。

今回用いたタンパク質はhTrxとDASK1 NTであり、それぞれ以下の表の通りのバンドの数が検出されたはずであった。

	EcoR V & Not I	EcoR I & Xho I
hTrx	2本	2本
DASK1 NT	4本	2本

## 課題

- (1) 結果・考察の項で述べた通りである。
- (2) タンパク質生成によって高純度のタンパク質を得ることが可能であるならば、例えば抗体医薬に用いられる医薬品として用いられる抗体を効率よく精製することが可能となる。
- (3) EcoR I, EcoR V, Not I の3つの制限酵素で同時に切断する。環状プラスミドがEcoR I, EcoR V, Not Iによって合計4箇所切断されるので4つのバンドとして観測される。塩基対は長い方から順に3.1kbp, 1.8kbp, 1054bp, 248bpとなる。