

実験 B タンパク質のイオン交換分離とゲル電気泳動による確認

1 目的

タンパク質をイオン交換分離し、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってを定性する。

2 実験

2.1 器具

- 電気泳動装置 (BIO-RAD)
- 水平回転振蕩器
- イオン交換筒
- バット

2.2 試薬

- 陰イオン交換樹脂 (BIO-RAD)
- 緩衝液 (A 液) : 10 mM Tris/HCl pH 8.2
- 緩衝液 (B 液) : 10 mM Tris/HCl pH 8.2 containing 500 mM NaCl
- サンプル Buffer : 試験管に 0.5 M Tris/HCl (pH 6.8) 1 mL、0.1 % BPB 0.5 mL、10 % SDS 1.6 mL、グリセリン 0.8 mL、2-メルカプトエタノール 0.4 mL と水 4 mL を加え混合する。
- 泳動用緩衝液 : 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1%SDS 溶液とし HCl にて pH 8.3 に 調整する。
- 泳動用ゲル (READY GELS J、分離ゲル 4-20%T、BIO-RAD)
- 分子量マーカー (250 10 kDa、BIO-RAD)
- CBB 溶液 (タンパク質染色用色素 Coomassie Brilliant Blue)
- 各種タンパク質 (以下のタンパクの内、等電点が離れている 3 種を選択する)

2.3 操作

混合タンパク質に A 液 2mL を加えて、スターラーを用いてゆっくり溶解させ、混合タンパク質溶液を作成する。混合タンパク質溶液 100 μ L に A 液 900 μ L を加えて 1/10 混合タンパク質溶液とする。

クロマト管にイオン交換樹脂 5mL を加え、下部からの水滴の滴下が無くなったら押さえフィルターを手フロン棒を使用して挿入する。これに A 液を約 50 mL 流して洗浄したのちキャップを閉める。

10mL 目盛り付き試験管 7 つに、A 駅と B 駅をそれぞれ以下の体積比で混合し分取用溶液を調製する。

A 液 : B 液 10 : 0 9 : 1 8 : 2 7 : 3 6 : 4 5 : 5 4 : 6

イオン交換カラムに混合タンパク質溶液を 1.5 mL 添加し、溶出液は廃棄する。水滴の滴下が無く

なったら分取用溶液を NaCl 濃度が低い順、つまり B 液の割合が小さい順に滴下し溶出駅を採取し、同じ順番で UV スペクトルを計測する。

8 本の 1.5 mL マイクロチューブに、50 μ L サンプル Buffer と 1/10 混合タンパク質溶液を 50 μ L をそれぞれ加え、マイクロチューブホルダーをつけ熱湯に 3 分間浸漬する。放冷したのちホルダーを外して泳動用資料とする。

泳動層に泳動用ゲルを装填したのち、泳動用緩衝液を注入し漏れがないことを確認する。その後外側にも緩衝液を入れる。

1 mL マイクロピペッターを用いてウェルを緩衝液で洗浄後、20 μ L ピペッターを用いてウェルに泳動用資料を 5 μ L 注入し、150 V の定電圧で電気分解を行い、気泡が生じることを確認する。30 分から 40 分後、青色が泳動層先端まで来ていることを確認し定電圧装置の電源を切る。

泳動層からゲルを外し、破らないように注意しながら CBB 溶液に浸し、水平回転振盪器で約 1 時間激しく揺らす。ゲルを水に移し水平回転振盪器で 1 時間洗浄し、撮影する。

3 結果

UV スペクトルから 280nm ピークの吸光度を読み取り図 2 に示した。

図 3 から複数のタンパク質が含まれていることがわかるので、分離は不完全であったことがわかるが、A 液と B 液の体積比が 6 : 4 においてはコンアルブミンのみシグナルが出ており、コンアルブミンのみ単離できたことがわかる。

分離ゲルの上端から角栄同バンドの中心までの距離の比を 3 から計測し、表 1 に示した。

先に求めた泳動距離を最も短いものを 1 とする相対距離に変換し、それを x 軸に、y 軸に分子量をプロットした (図 4)。最小二乗法で検量線を作成する際に、とりえる全ての相対移動度の区間で R^2 値を求めたところ、相対移動度が最も小さい 3 つを除いた区間が $R^2 = 0.986$ で最大だったので、その区間の値のみを用いて検量線を作成した。

その検量線から分子量が 71, 29, 15 kDa と定量できた。そこからコンアルブミン、カルボニックアンヒドラーゼ、ミオグロビンと同定できた。

4 考察

図 3 の No.1, No.2 の間でミオグロビン、カルボニックアンヒドラーゼが無くなっているのが A 液と B 液の割合を 10:0 から 9:1 の間で細かく区切れば、ミオグロビンとカルボニックアンヒドラーゼを分離できると考えられる。

5 設問

5.1 (1)

緩衝液の pH は 8.2 だからタンパク質は不の電荷を帯びているので、pI が大きいタンパク質ほど早く溶出すると考えられる。

5.2 (2)

ベンゼン環を持つフェニルアラニン、トリプトファン、チロシン (図 1) が考えられる。

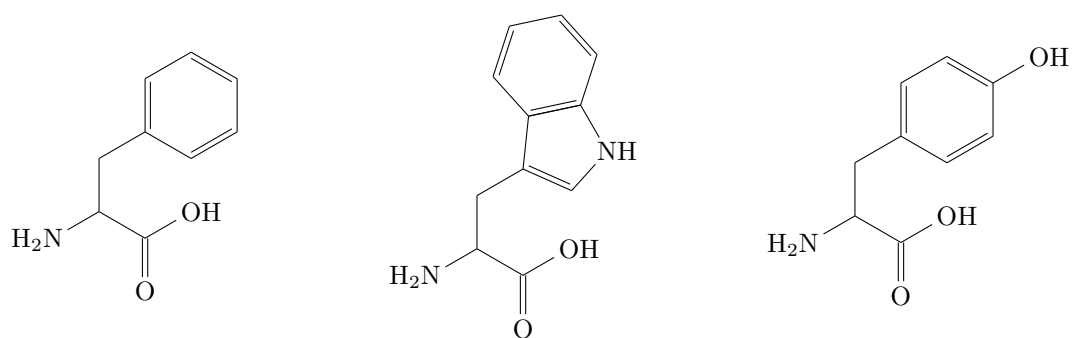


図1 フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン

5.3 (3)

設問1で述べたようにタンパク質は不電荷を帯びているので下部電極は陽極である。

5.4 (4)

サンプルの比重をバッファと近くする役割。

5.5 (5)

タンパク質の S-S 結合を切断し、立体構造を破壊する役割。

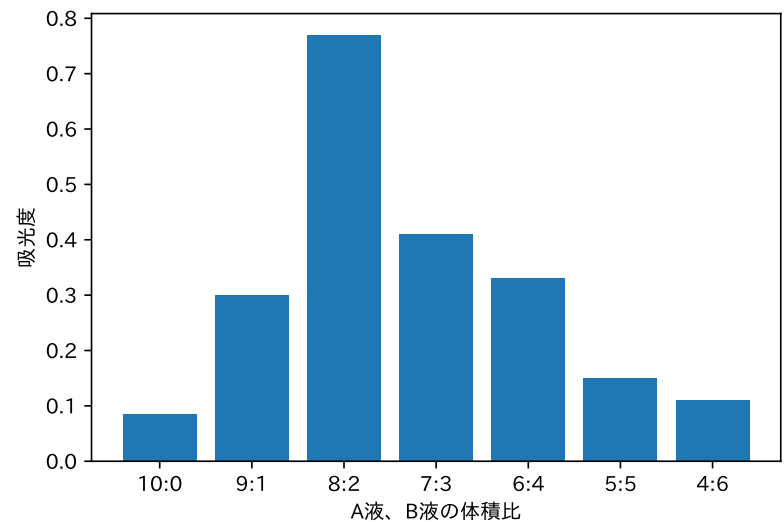


図 2 UV スペクトルの 280 nm の吸光度

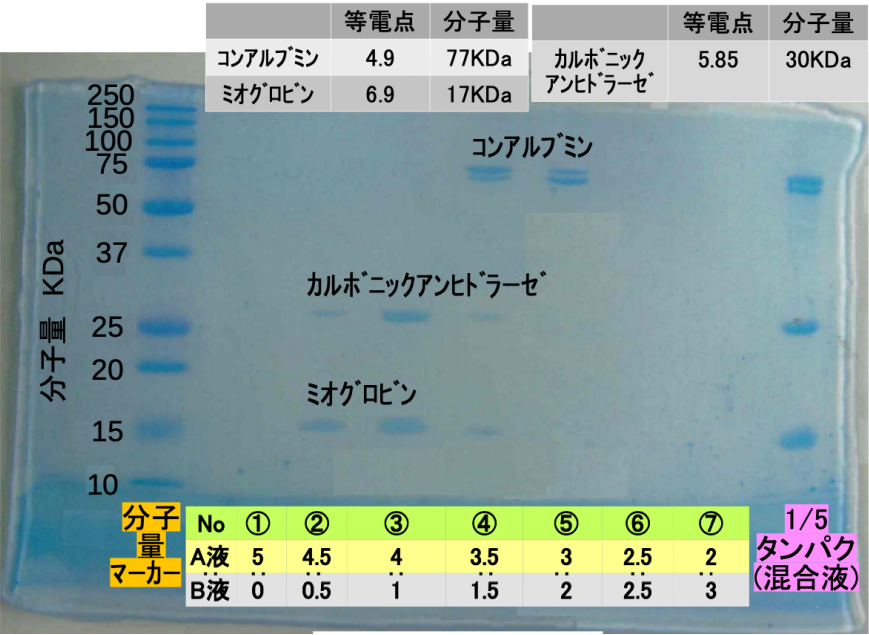


図 3 分子量マーカーの電気泳動結果

表 1 電気泳動でのタンパク質の移動距離

分子量 kDa	泳動距離 [px]
250	22
150	41
100	67
75	95
50	155
37	215
25	318
20	372
15	457
10	526

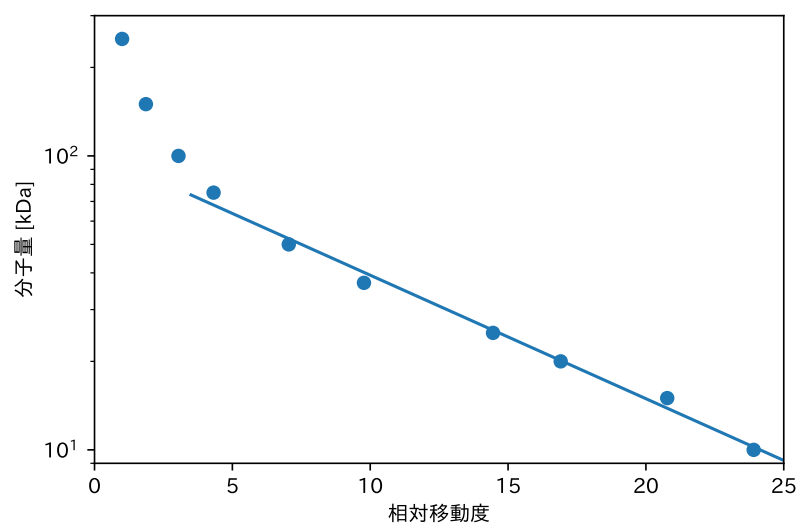


図 4 電気泳動の結果