

分析化学実験 5 レポート

— 生化学分析 —

2020 年 5 月 30 日

03-200796 宗形 翼

実験 A 免疫分析

1 目的

サンドイッチ法の ERISA により、代表的な抗原であるヒト IgG を定量する。ERISA に特有な High-dose hook effect を経験し、B/F 分離の有効性と欠点について考察する。

2 実験

2.1 器具

- マイクロタイター用比色計
- 恒温槽 (37 °C)
- 冷蔵庫 (5 °C)
- 攪拌器
- ELISA 用マイクロタープレート
- 連続分注ピペット
- マイクロピペット
- 試験管
- 試験管立て

2.2 試薬

- 0.1 M 炭酸緩衝液
炭酸ナトリウム 2.52 g と炭酸水素ナトリウム 8.4 g を水 1 L に混合する。
- 1/15 M リン酸緩衝液 (PBS)
リン酸二水素カリウム 2.73 g とリン酸水素二ナトリウム・12 水和物 16.8 g を水 1 L に溶解し、塩化ナトリウムを最終濃度が 0.08% になるように加える。この溶液の pH は 7.2 である。
- 1/15 M リン酸-Tween20 緩衝液 (PBS-T)
PBS 溶液に濃度が 0.05% となるように界面活性剤 Tween20 を加える。
- リン酸緩衝液-牛血清アルブミン溶液 (PBS-B)
リン酸緩衝液 (PBS) に牛血清アルブミンを最終濃度 1% になるように加え、泡がたたないように徐々に溶解する。
- リン酸緩衝液-Tween20 牛血清アルブミン溶液 (PBS-TB)
PBS-T 溶液に牛血清アルブミンを最終濃度 % になるように加え、泡がたたないように徐々に溶解する。
- クエン酸-リン酸緩衝液
水 1 L にクエン酸一水和物 5.1 g およびリン酸水素二ナトリウム 12 水和物 18.4 g を溶かす

(pH 5.0)。

- 抗ヒト IgG 溶液 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
試験管に抗ヒト IgG 原液 (2.4 mg /mL) をマイクロピペットで 33.34 μL 計りとり、これに 0.1 M 炭酸緩衝液 4 mL を加えて良くふりまぜる。
- ヒト IgG 溶液 (16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)
ヒト IgG 2.76 μL をガラス試験管にはかりとり、PBS-T 溶液 2 mL を加えて良く混ぜる。
- 抗ヒト IgG-ペルオキシダーゼ (HRP) 溶液
原液 0.5 μL に PBS-TB 溶液 4 mL を加える (8000 倍に希釈)
- 基質溶液
o-フェニレンジアミン 60 mg を 100 mL ビーカーにはかりとり、これにクエン酸-リン酸緩衝液 20mL を加え、スターラーを使用して溶解する。使用直前に 5 % 過酸化水素水 100 μL を加えてよく混ぜる。
- 5% 過酸化水素水
- 2 M 硫酸

2.3 操作

2.3.1 抗体感作

抗ヒト IgG を ELISA プレートに吸着させる。抗ヒト IgG (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶液を 2 個の ELISA プレートに連続分注ピペットを用いて 100 μL ずつ各穴に分注し、37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温槽中に 1 時間放置する。以後 2 つのプレートに同じ操作をする。

ELISA プレートを裏返して勢いよく溶液を除去し、紙で表面の溶液を吸い取る。これに PBS 溶液を 200 μL ずつ全ての穴に連続分注ピペットで分注浸透する。この操作（プレート洗浄操作）を三回繰り返す。

ELISA プレートを裏返して勢いよく PBS 溶液を除去し、紙で表面の溶液を吸い取る。これに PBS-B 溶液を 200 μL ずつ全ての穴に連続分注ピペットで分注し、ラップをかぶせ 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温槽中に 1 時間放置する。

プレート洗浄操作を三回繰り返す。

2.3.2 抗原抗体反応

ヒト IgG (16 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶液を 14 本の試験管に PBS-T 溶液を用いて倍数希釈を行い、各 1 mL に調整する。この溶液をマイクロピペットも用いて、ELISA プレートに希薄溶液から順に 100 μL ずつ分注する。このほかに対照として PBS-T 溶液のみを一点とる。これにラップをかぶせ、37 $^{\circ}$ の恒温槽中に 20 分間以上放置する。

2.3.3 酵素標識抗体の抗原抗体反応

ここまで用意した 2 個の ELISA プレートの内一つに対して、ヒト IgG 溶液に抗ヒト IgG-HRP 溶液 100 μL ずつを全ての穴に連続分注ピペットで分注し、ラップをかぶせ 37 $^{\circ}\text{C}$ の恒温槽中で 20 分間

放置し、ELISA プレートに PBS-T 溶液で 2 回、PBS 溶液で 1 回洗浄する。

もう一つの ELISA プレートには、PBS-T 溶液で 2 回、PBS 溶液で 1 回洗浄した後に先ほどのプレート同様な操作を行う。

2.3.4 基質の酵素反応と定量操作

調製直後の基質溶液を 100 μL ずつ ELISA プレートの全ての穴に連続分注ピペットで分注する。30 秒程度室温に放置し、着色を確認後 2M 硫酸 25 μL ずつを全ての穴に連続分注ピペットを用いて加え、酵素反応を停止させる。

マイクロプレートリーダーを用い、波長 490 nm で各穴の吸光度を測定する。

3 結果

ヒト IgG 濃度と吸光度を片対数グラフにプロットし図 1 に示した。洗浄ありのデータから以下のシグモイド曲線に最小二乗法でフィッティングし、検量線を作成し図中に書き加えた。

$$f(x) = \frac{a}{1 + \exp(-bx - c)} + d$$

洗浄を行ったものは 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 程度以上のものは吸光度が飽和した。一方洗浄を行わなかったものは 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上から High-dose hook effect が現れ、分析値を過小評価してしまう危険性がわかった。

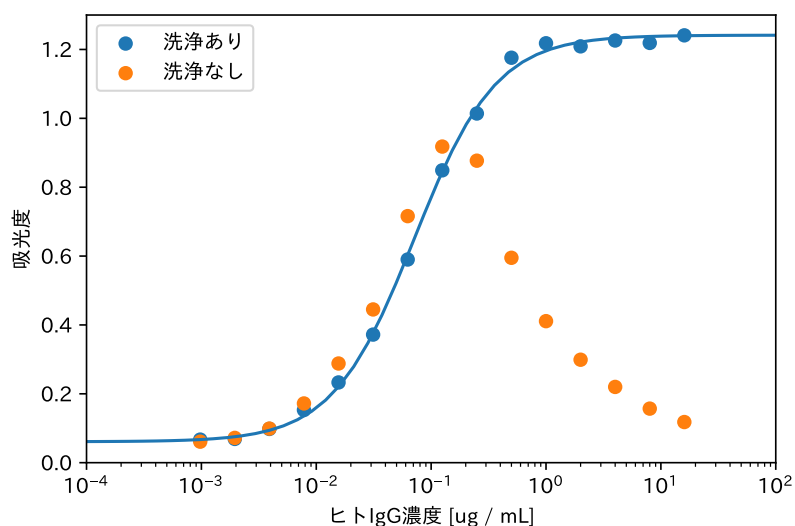


図 1 2 次多項式近似による検量線

4 考察

設問 (5) の操作を行ったことによって、過抗原領域で過小評価を避けることができるようになった。

5 設問

5.1 (1)

2, 4, 6, 7 の操作について、溶液を丁寧に除去することで過小評価を防ぐ。

6 の操作について、他の穴に溶液が混入しないように注意する。

8 の操作について、硫酸を気質を加えた順番と同じ順序で入れることで、反応時間が等しくなるようにする。

5.2 (2)

操作 2 は ELISA プレートに固定した抗ヒト IgG にヒト IgG を結合させる操作である。

操作 3 は操作 2 で結合した抗原に酵素で評した抗体を結合させるための操作である。

5.3 (3)

ホモジニアス法は操作が簡単だが High-dose hook effect が起こりやすい。

5.4 (4)

低濃度領域では吸光度を測定するときのバックグラウンドの影響が大きくなるから。

また高濃度領域では、ELISA プレートに固定した抗体のほとんど全てに抗原が結合することになり、標的認識抗体と結合しない抗原が多くなるから。

5.5 (5)

遊離している抗原を減らせば良いので、PBS 溶液で洗浄する。

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 3 に示した。

図 4 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 4 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 5)。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 4 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 2) が考えられる。

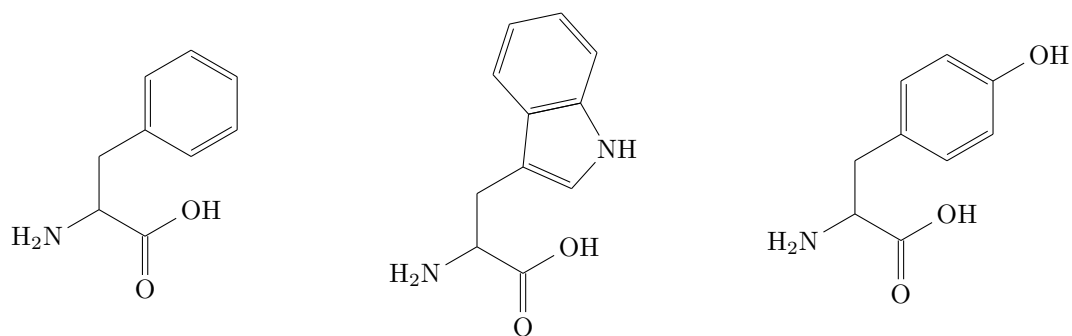


図2 フェニルアラニン、トリプトファン、チロシン

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。

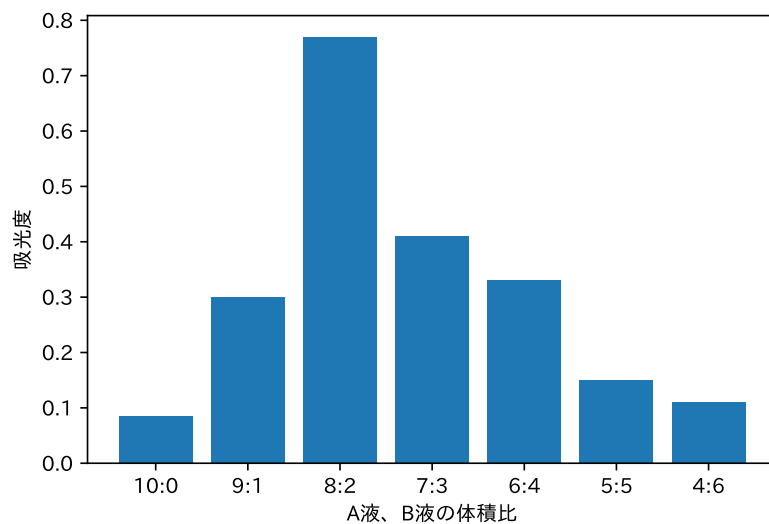


図3 UV スペクトルの 280 nm の吸光度

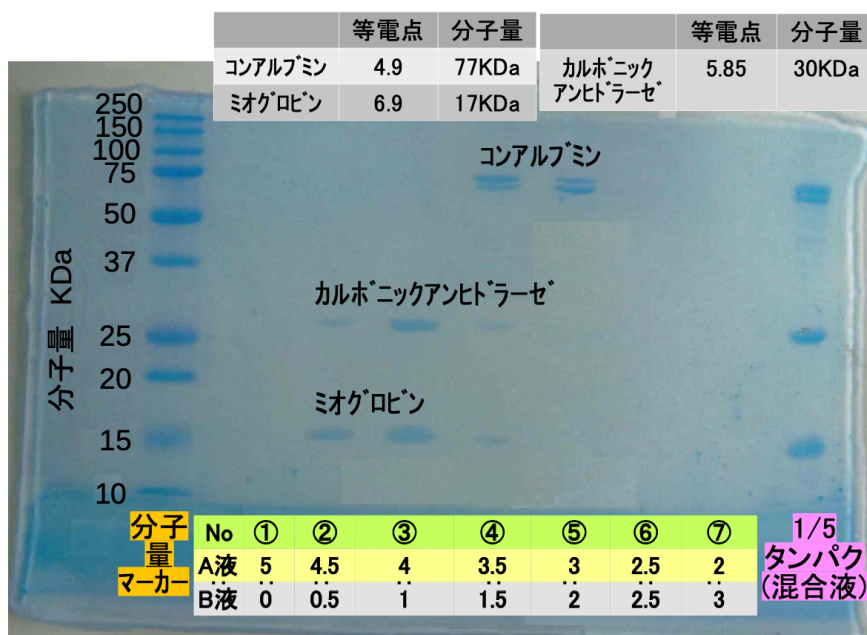


図4 分子量マーカーの電気泳動結果

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

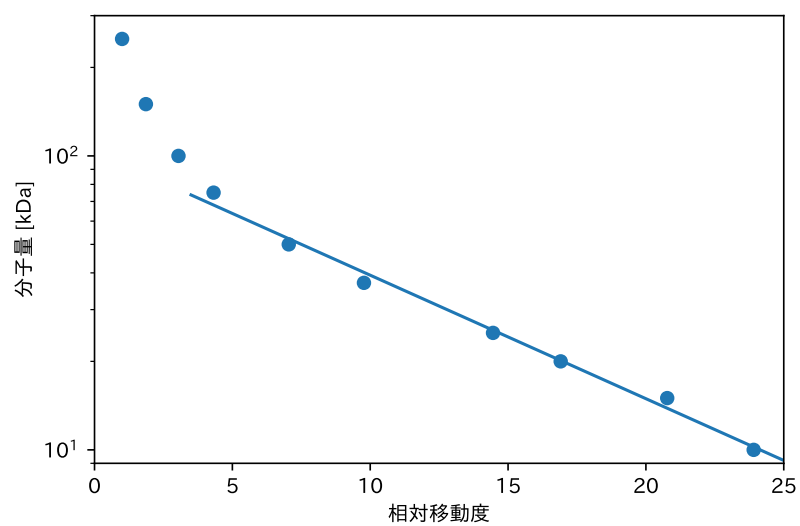


図 5 電気泳動の結果