

令和 5 年度 化学生命工学実験 3

タンパク質実験

学籍番号 : 082110424

氏名 : 中村優作

実施日 : 10 月 4 日

1 目的

2 操作

2.1 アフィニティクロマトグラフィによる sfGFP-H の精製

電気泳動用に、大腸菌破碎液 $100\mu\text{L}$ を分注した。アフィニティクロマトグラフィ担体が詰められたカラム (Bio-Scale Mini Profinity IMAC カートリッジ) に、表 1 のように順次溶液を打ち込んだ。

表 1: sfGFP-H の精製手順

ステップ	使用 buffer	分取量 (mL)	使用チューブ (mL)
1. カラム平衡化	IMAC B1 buffer	8	15
2. タンパク質結合	大腸菌破碎液	2	15
3. カラム洗浄	IMAC B2 buffer	20	50
4. タンパク質溶出	IMAC B3 buffer	0.5×8 本	15

打ち込む際は、プランジャーを抜いたシリンジをカラムに装着し、シリンジ内に溶液をピペットで加え、プランジャーを押し込むことで溶液をカラムに流し込んだ。また、カラムに溶液を流し込む速度は、1秒に2滴程度となるように調節した。また、打ち込む溶液を交換する際は、カラムからシリンジを外してからプランジャーを抜いた。

2.2 紫外・可視分光法によるタンパク質の濃度決定

2.2.1 測定に用いるタンパク質の調整

タンパク質溶出によって分取した 8 本のチューブのうち、目視で最も濃いと判断した 2 番目に溶出したチューブを溶出液として取り扱った。1.5mL チューブに、溶出液 $100\mu\text{L}$ を取り、 $900\mu\text{L}$ の IMAC B3 buffer を加えることで、 $1/10$ 倍に希釈した。

2.2.2 分光光度計による吸光度の測定

$1/10$ 倍に希釈した溶出液を、キュベットに移動し、分光光度計にかけて吸光度を測定した。測定波長は、 280nm と 488nm とした。 488nm で測定した際、吸光度が 2 を超え、定量的信頼性が下がると判断して、溶液を $1/20$ 倍希釈になるように調整した。 $1/20$ 倍に希釈した溶液を、キュベットに移動し、分光光度計にかけて吸光度を測定した。

2.3 ブラッドフォード法によるタンパク質の定量

タンパク質の標準サンプルとして、 $8\text{mg}/\text{mL}$ の BSA 溶液 $20\mu\text{L}$ を用意した。この BSA 溶液を IMAC B3 buffer を用いて系列希釈し、 $0.8\text{mg}/\text{mL}$, $0.4\text{mg}/\text{mL}$, $0.2\text{mg}/\text{mL}$, $0.1\text{mg}/\text{mL}$, $0.05\text{mg}/\text{mL}$ の溶液各 $50\mu\text{L}$ を 1.5mL チューブに調整した。

また、溶出液 $1\mu\text{L}$ に $49\mu\text{L}$ の IMAC B3 buffer を加えた、 $1/50\times$ 溶出液と、コントロール用の $50\mu\text{LB3}$

buffer を 1.5mL チューブに調整した。

2.3.1 ブラッドフォード溶液の混合

1.5mL チューブ内で、 $50\mu\text{L}$ のサンプルに $200\mu\text{L}$ のブラッドフォード試薬を加え、一旦混合した。その後、 $750\mu\text{l}$ の超純水を添加した。この時、赤色から青色に溶液の色が変化した。

2.3.2 分光光度計による吸光度の測定

調整したブラッドフォード溶液の全量 ($1000\mu\text{L}$) を用いて、吸光度の測定を 595nm で分光光度計を用いて行った。

2.4 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による sfGFP-H の解析

2.4.1 泳動サンプルの調整

ゲルは ATTO 社の E-T 12.5L ePAGE 12.5%

3 結果

3.1 紫外・可視分光法によるタンパク質の濃度決定

1/20 倍に希釈した溶液の吸光度を、 280nm と 488nm で測定した。吸光度の測定結果を表 2 に示す。

表 2: タンパク質溶出液の吸光度の測定結果

測定波長 nm	吸光度
280	0.467
488	1.134

3.2 ブラッドフォード溶液の、分光光度計による吸光度の測定

調整したブラッドフォード溶液を用いて、吸光度の測定を 595nm で分光光度計を用いて行った結果を表 3 に示す。

4 考察

5 設問/課題

5.1 sfGFP の 280nm における mol 吸光係数 ϵ_{280} の計算

ExPasy の Translate に与えられた sfGFP のアミノ酸配列を用いて、5'3'Frame1 のアミノ酸配列を算出した。その後、ProtParam を用いて分子量と理論上の mol 吸光係数を求めたところ、分子量は 2.8180g/mol 、理論上の mol 吸光係数は $18910\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ となった。

表3: ブラッドフォード溶液の吸光度の測定結果

ブラッドフォード溶液	吸光度
0.8mg/mL	2.063
0.4mg/mL	1.046
0.2mg/mL	0.994
0.1mg/mL	0.932
0.05mg/mL	0.874
B3 buffer	0.828
1/50x 溶出液	1.151

5.2 吸光度を用いた sfGFP 濃度の計算

5.1で計算した mol 吸光係数と、実測した 280nm における吸光度 A_{280} の値を用いて、Lambert-Beer の式から、sfGFP の濃度を計算したところ以下のようなようになった。

$$c = \frac{0.467}{18910\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}} = 2.47\mu\text{M} \quad (1)$$

6 参考文献

参考文献

- [1] 中村優作 1991