

「ラボ on the テスク」

生命科学系 学習プログラム

タンパク質を解析しよう

千葉大学

1st STEP…アクリルアミドゲル電気泳動

タンパク質の解析方法

<サンプル>

- うさぎ血清、牛血清、分子量マーカー

<必要な器具>

- ピペット チップ 電気泳動槽 電源装置
- タッパー ゴミいれ ウォーターバス

<試薬>

- 泳動バッファー 染色液(クマシーブルー) 水
- アクリルアミドゲル (パジェル)

* **注意** アクリルアミドゲルは神経毒および発ガン物質を微量に含む可能性がある
ので支援員が操作します。

- SDS 化液(濃い青色の液)

「実験を始める前にマニュアル読んで勉強してね。」

*タンパク質

私たちの体を構成するタンパク質は約 10 万種あると推定されています。

このタンパク質を形づくっている基本物質はアミノ酸です。ヒトは20 種類のアミノ酸を使用しています。また、このアミノ酸には酸性のアミノ酸、中性のアミノ酸、アルカリ性のアミノ酸の 3 種類がありタンパク質中に含まれるこれらアミノ酸の種類と量によりそのタンパク質が賛成の性質を帯びるか中性の性質を帯びるかまたはアルカリ性の性質を帯びるかが変わってきます。

タンパク質分子は細胞を形づくったり、化学反応を行ったりする物質の、これがないと私たちは生きてゆけません。また、これらのタンパク質分子は生きていくために使用するとどんどん壊れていきます。そのため毎日作り直しています。

だからみなさんも毎日肉や魚、牛乳といったタンパク質を多く含む食品を取らなければいけないのです。

* アクリルアミドゲル電気泳動とは

アクリルアミドという物質は比較的密な格子構造を作る化学物質です。身近なところでは車のワックスの中にも入っています。このアクリルアミドを用いてゲルを作成し、その中にタンパク質を電気力で通すことにより、大きさによってタンパク質を分けることができます。大きいタンパク質は流れにくく、小さなタンパク質は流れやすいという性質があります。

* SDS 化とは

SDS というのは陰性の界面活性物質(石鹼のようなもの)です。この物質はタンパク質を包み込むことで、1)タンパク質の立体構造を壊し、直鎖状にします。また、2)タンパク質の表面が SDS で覆われることによりタンパク質の見かけの電気陰性度が SDS の電気陰性度になります。この性質を利用し、比較的均質にタンパク質の大きさを分離することができます。

<方法>

白衣を着る

手袋をする

落ち着いて行動する

1. サンプルに SDS 化液10 μ を加える。
2. フローターにチューブを挿し、お湯に浮かべる。
3. 5分待つ
4. サンプルの入ったチューブを遠心機にかけ、液をチューブの底に集める。
5. ゲルを泳動槽にセットし(支援員)、泳動バッファーを入れる。
6. ゲルの穴(ウェル)に分子量マーカーを5 μ 入れる。
7. ゲルの穴(ウェル)にサンプルを10 μ 入れる。
8. 電源を入れる。
9. 30分泳動する
10. ゲルをはずす。
11. 各自のゲルをタッパーに入れ、ブロットイングバッファーにつける。

2nd STEP…ウェスタンブロット法

ウェスタンブロット法による目的タンパク質の検出

今回はウサギ血清中に含まれるウサギの抗体分子を検出したいと思います。

<抗体分子とは>

抗体分子は、細菌やウイルスの侵入を防ぎ、体を病原体から守る大切なたんぱく質です。皆さんも予防接種をしたことがあると思いますが、その時に体の中で作られるのが、注射したインフルエンザウイルスや麻疹(はしか)ウイルスなどに対する抗体分子です。

抗体は、

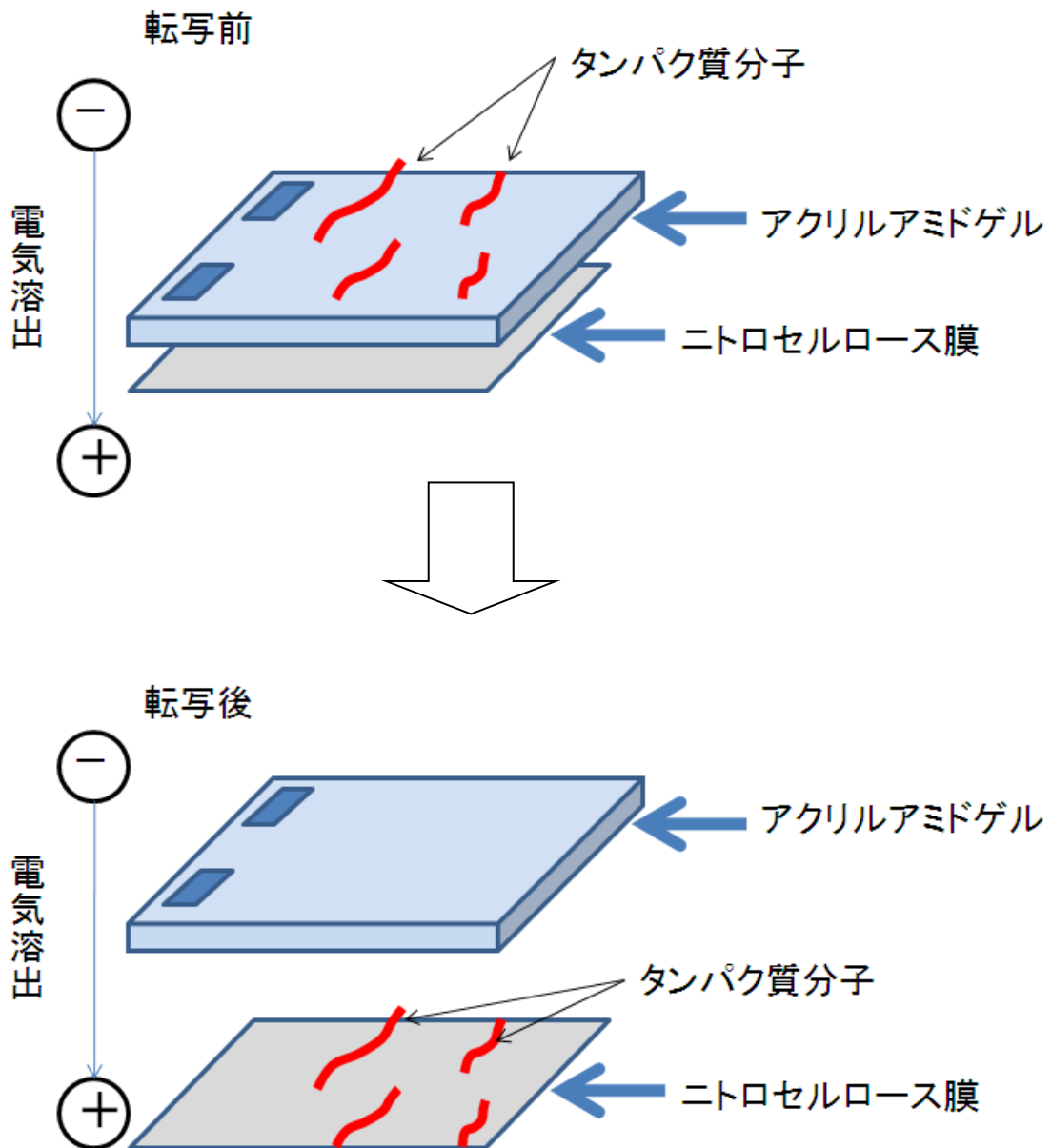
- 1) あらかじめ作っておかないと効き目がないこと、
- 2) 予防接種などの時のように特定のものにしか反応しないという性質があります。

たとえばインフルエンザウイルスは突然変異により毎年違うウイルスになるため、毎年予防接種をやり直さないといけません。ちょっと嫌だけど仕方ないのです。

<ウェスタンブロット法>

タンパク質を含む液の中から特定のタンパク質分子が含まれているかを検出する方法です。

ウェスタンブロット法では、あらかじめアクリルアミドゲルにより分離したタンパク質を、ニトロセルロース膜やナイロン膜に電気を使って写し取ります。

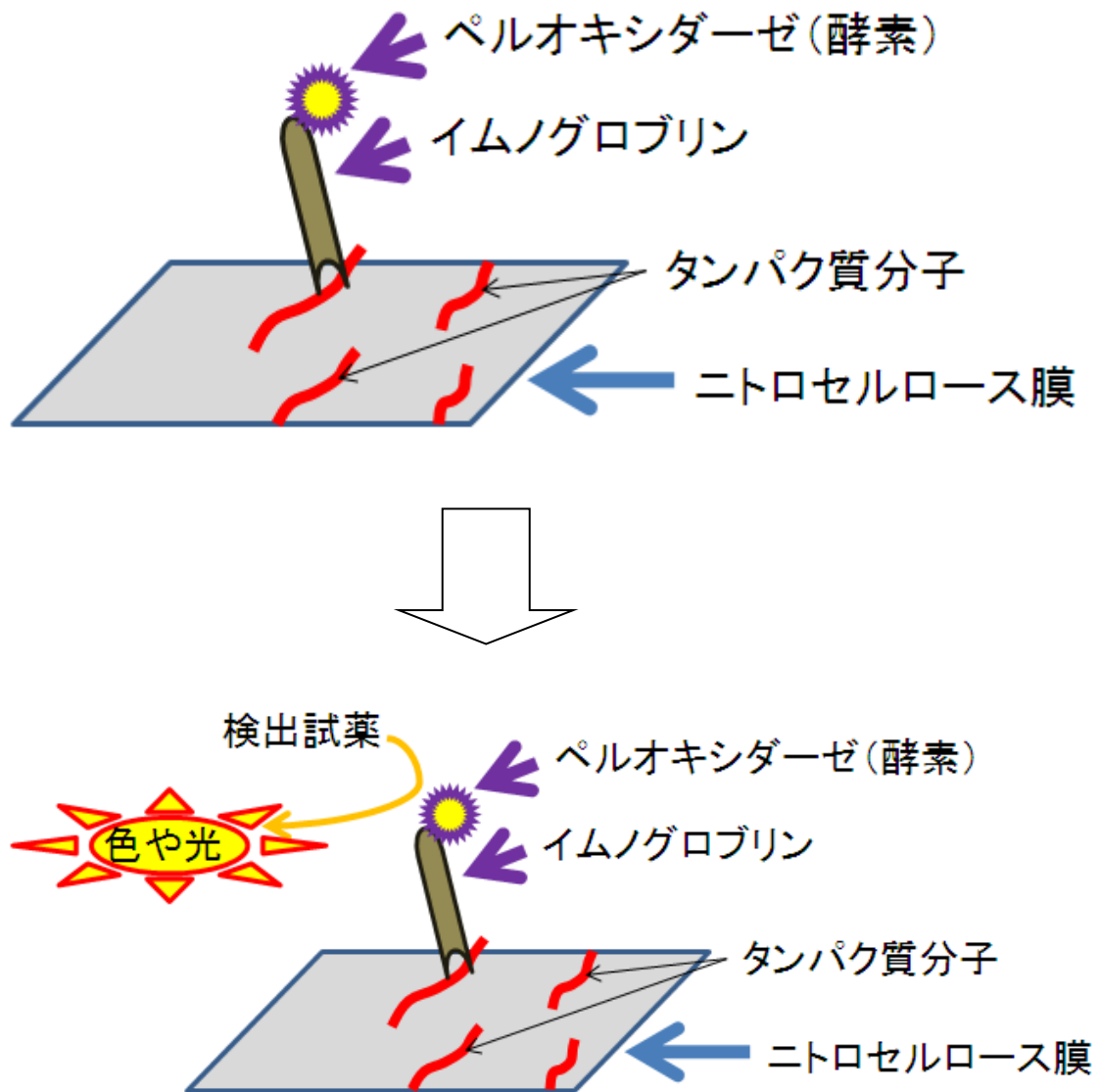


目的タンパク質の検出方法

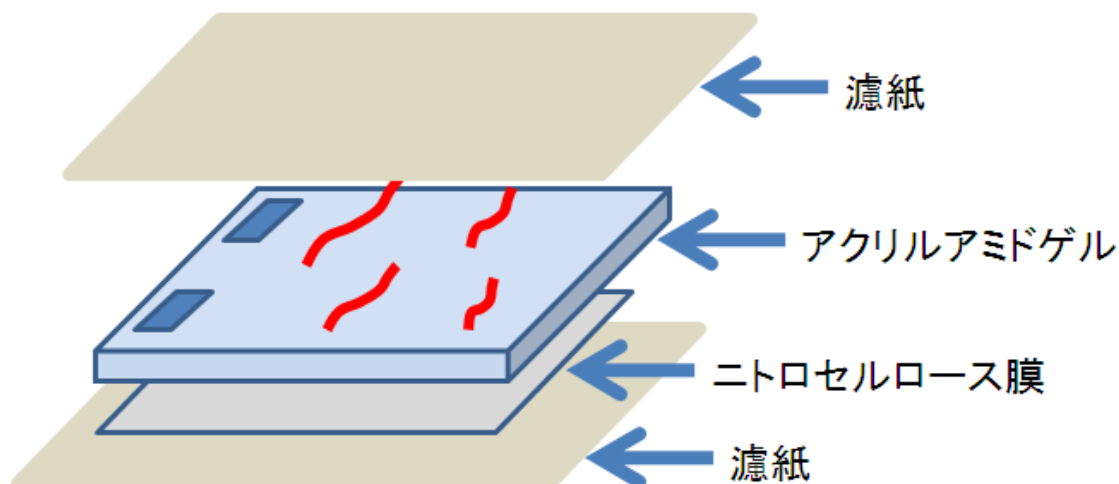
ニトロセルロース膜に転写後、目的タンパク質の検出試薬を用いてタンパク質を検出します。

今回は、ウサギの抗体分子に結合するイムノグロブリンを用いて検出します。

また、このイムノグロブリンにはペルオキシダーゼという酵素が結合しており、試薬を用いた化学反応により色が出たり、光が出たりするという性質があります。この性質を組み合わせることで目的のタンパク質を検出することができます。



12. セミドライプロッターに、ブロットイングバッファーをしみ込ませた濾紙をのせる。
13. その上にバッファーをしみ込ませたニトロセルロース膜をのせる。
14. 次にアクリルアミドゲルをのせる
15. 最後にブロットイングバッファーをしみ込ませた濾紙を 1 枚のせる。



16. プロッターをセットし、10～15V の電圧で 15 分間、転写する。
17. プロッターのふたをあけ、ゲルと膜をそれぞれ別のタッパーに回収する。
 - A ニトロセルロース膜は 18 からの手順で行う。
 - B ゲルは 27 番からの手順で行う。

18. ニトロセルロース膜は反応装置にセットする。
19. ポンプで吸引しながら、ブロッキング液(0. 3%スキムミルク)をかける。
20. イムノグロブリン液をかけ、10 分反応させる。
21. ポンプで吸引する。
22. 洗浄液で 3 回洗浄する。
23. ニトロセルロース膜をはずし、タッパーに入れる。
24. 発色液入れ、ゆする。
25. 発色したら観察(スケッチ)する。

26. ゲルには染色液を30ml ぐらい入れ、ゆする。
27. タンパク質の青いバンドが見えてきたら観察する。
28. スケッチする。
29. ゲルドライヤーにかけて乾燥させる。

<結果>

1.スケッチしよう。

2.スケッチから気づいたこと、わかったことを書こう

<考察>

実験レポート (提出してください)

氏名 _____

目的

Q1.アクリルアミド電気泳動とは何を解析する実験でしょう

Q2.今回の実験ではどんなことがわかるでしょう

材料と方法

Q3 どんなものを使ったか、書いてみましょう

Q4.どのように実験しましたか

実験レポート（提出してください）

氏名 _____

結果

Q5.それぞれのサンプルがどんなふうに見えたか言葉で表現してみましょう。

考察

Q6.どんなことが考えられましたか。

<感想(面白かったこと、難しかったことなど)>

探求課題 （次回提出してください）

氏名

タンパク質は体の中でどんなところに使われているでしょう

細胞の中でタンパク質が果たしている役割は何？

毎日、食事でタンパク質を取らなければならないのはなぜでしょう？