

NSL 講座(4日目)参加レポート

4年B組 糸山 和香

1. 概要

2008年8月26日(月)、NSL 講座「タンパク質の機能の探求」(講師:奈良女子大学生生活環境学部教授 植野洋志先生)に参加し、タンパク質の定量法、アミノ酸分析、SDS-PAGE について学んだので、以下に報告する。

講義:アミノ酸の構造を見る方法を学習した。タンパク質の定量法、酸加水分解、SDS-PAGE、Western blot の方法と、目的を学んだ。

実験:紫外線吸光度法を用いて、タンパク質の定量法の実験を行った。また、SDS-PAGE、Western blot の実験を行った。

キーワード タンパク質の定量法、SDS-PAGE、Western blot、アミノ酸、タンパク質

2. 講義内容

(1)タンパク質の構造を見る必要性

タンパク質を学ぶことで、病気を治すことも、防ぐことも可能となってくる。タンパク質とは、アミノ酸が多数連結(重合)してできた高分子化合物であり、1次構造から4次構造までの階層構造をもつ。1次構造では1本鎖で、R-が離れているため機能しないが、折りたたんで(folding)3次構造になり、R-が近づき合うことで機能を果たすようになってくる。機能を知るには構造(形)をみななければならない。

(2)タンパク質の定量(Beer's law)

タンパク質を含む溶液を染める。染まる程度を光学的に測定することで、溶液に含まれているタンパク質の濃度を調べることができる。溶液に紫外線を当て、その吸光値(光の吸収強度)が高いほど、溶液中のタンパク質量が多いことになる。

(3)SDS-PAGE 解析

網目状の構造をもつ SDS-PAGE 用ゲルに、大きさのわかっているタンパク質と、大きさのわからないタンパク質を流し込み、電圧をかけて、大きさの分らないタンパク質がゲル上をどれだけ移動したかによって、タンパク質の大きさを調べる電気泳動法である。

(4)Western blot

SDS-PAGE 解析でタンパク質の分離を行った後、そのゲルをメンブレンに転写し、抗体を利用して染めることで、抗体と結合するタンパク質を可視化する方法である。

3. 実験

数班に分かれて、実験を実施した。ここでは、「タンパク質の定量」の実験について報告する。

○「タンパク質の定量」(Beer's law)

[目的]

サンプル(ゼラチンに生パイナップルの小片を加えたもの)のタンパク質濃度を測定する。

[原理]

染色液(プロテイン圧制)の中の色素「クーマシーブリリアントブルー(Coomassie brilliant blue、略称 CBB)」がタンパク質と結合すると、最大吸収波長が 465nm から 595nm に移動する。これより、タンパク質濃度の測定が可能になる。

[方法]

(1) 染色液の 4 倍希釈

染色液 10ml に純水 40ml を加え、50ml の希釈溶液を調製した。

サンプルのタンパク質濃度は、タンパク質濃度のわかっている溶液から作成した検量線を基に測定する。よって、まずは BSA(ウシ血清アルブミン)溶液を用いて、検量線を作成する。

(2) 各 BSA 溶液の調製

タンパク質濃度[mg/ml]が 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.8 の溶液を、1.0mg/ml BSA 溶液からそれぞれ調整した。

(3) 検量線の作成

(a) BSA と CBB の吸着反応

- ①各 BSA 溶液を 20 μ l 試験管に入れた。
- ②希釈した染色液を 1ml 加え、試験管ミキサーでよく混ぜた。
- ③室温で 5 分間反応させた。

(b) 各 BSA 溶液のタンパク質濃度の測定

- ①水 20 μ l に希釈した染色液 1ml を入れた溶液の、595nm における吸光度

をブランクとした。

- ②各 BSA 溶液の 595nm における吸光度を 2 回ずつ測定した。
- ③②の測定値から①のブランクの値を引くことで吸光値を算出した。
- ④③をグラフ化(縦軸: 595nm における吸光値、横軸: タンパク質濃度 [mg/ml])して検量線を作成し、近似式 $y=ax$ を求めた。

(4) サンプルのタンパク質濃度の測定

(a) タンパク質と CBB の吸着反応

サンプルについて、(3) (a)と同様の方法で反応させた。

(b) サンプルのタンパク質濃度の測定

(3) (b)と同様に、サンプルの 595nm における吸光度を 2 回測定した。その測定値を検量線の近似式に代入し、サンプルのタンパク質濃度を算出した。

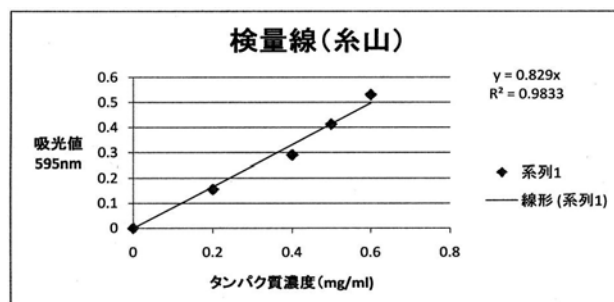
[結果]

方法 (3) の検量線作成における、吸光度の測定結果を表 1 に示す。

表1 タンパク質濃度(mg/ml)と吸光度

タンパク質濃度 (mg/ml)	0	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.8
吸光度① (nm)	0.421	0.679	0.672	0.822	1.003	1.043	1.005
吸光度② (nm)	0.444	0.599	0.522	0.734	0.857	0.974	0.843
吸光度①-ブランク①	0	0.258	0.251	0.401	0.582	0.622	0.584
吸光度②-ブランク②	0	0.155	0.078	0.29	0.413	0.53	0.399

また、表 1 のデータをグラフ化したところ、次のグラフのようになった。



上のグラフより、検量線の近似式は、

$$y=0.829x$$

である事がわかった。

方法（４）のサンプルのタンパク質濃度の測定における、吸光度の測定結果を表２に示す。

表２ サンプルのタンパク質濃度の測定

サンプル	1倍希釈
吸光度① (nm)	0.643
吸光度② (nm)	0.675
吸光度①-ブランク①	0.281
吸光度②-ブランク②	0.313
[吸光度-ブランク]の平均値	0.297

この結果を、グラフ１の検量線の近似式 $y = 0.829x$ に代入すると、サンプルのタンパク質濃度を求めると、

$$x = 0.297 / 0.829 = 0.3582 \dots \approx 0.358$$

よって、サンプルの１倍希釈のタンパク質濃度は約 0.358mg/ml とわかった。



[考察]

標準液での測定より、タンパク質濃度と吸光度は比例した。このことより、サンプルの２倍希釈、３倍希釈の吸光度の値は１

倍希釈よりも低く、タンパク質濃度も下がると考えられる。

４. その他の実験

その他のタンパク質の構造を調べる実験を次に紹介する。

<SDS-PAGE> (=SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

タンパク質を分離する方法の一つ。アクリルアミドと呼ばれる化合物で出来たゲル(寒天のような篩い構造のもの)中にタンパク質を通過させる(泳動させる)ことで、一定時間での移動度とタンパク質を構成するアミノ酸の数(別に分子量で表現する)が比例することから、タンパク質を分類する方法である。長い分子ほどゲルの篩いの目に引っ掛かって移動度は小さくなり、短い分子はどんどん先へ移動してしまう。

SDS=荷電した界面活性剤(石鹼のような化合物)で、これをアミノ酸の正に荷電した残基に結合させることで、分子すべてを負に荷電した状態にする。これを泳動させると、移動度とタンパク質分子の長さ(分子量)が比例する結果が得られる。



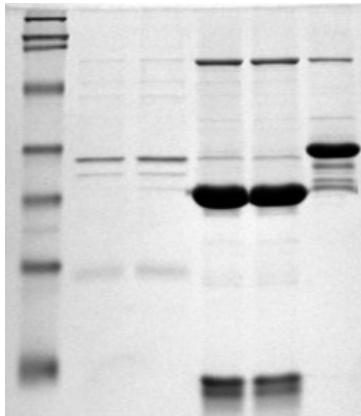


図1 SDS-PAGE

左1列：分子量を決めるためのマーカー
右5列：分析対象のタンパク質



< Western blot >

Western blotting は、SDS-PAGE 後のゲルを電気にかけることでメンブレンに転写して、抗体を使ってタンパク質をマークし、その抗体への抗体(二次抗体)をかけたあとで、多くはAP(alkaline phosphatase)によって発色するものである。

4. NSL 講座の参加した感想

今回学んだタンパク質の分離の方法は始めて聞く内容だったが、本物の実験器具を使っただけの実験で、とても分かりやすく、楽しく学ぶことができた。

本プログラムで特に印象に残った内容は、ゲルを用いてタンパク質の分離を行ったとき、タンパク質の大きさによってゲル上を移動する距離が違うということである。また、タンパク質の機能を見るためには様々な方法があるということも知った。

学生の方達と一緒に実習をさせていただいたことで、大学に入ってからの実験や講義に興味をもつことができ、非常に楽しく過ごすことができた。

タンパク質に対する抗体を用いることで、特異的にタンパク質を検出することができる。

