

2011.8.8-8.9 SSH 日比谷高校-首都大学東京分子物質化学専攻
キャンパス訪問・体験実験

・実験・指導の項目
タンパク質の精製と結晶化実験

・簡単な内容与时程

8月8日(月) 参加者16名

10:30-11:00 実験背景の説明

11:00-12:00 タンパク質の性質と実験に関する予備知識の導入

13:00-16:00 遠心分離を利用したヘモグロビンの精製と結晶化実験

8月9日(火) 参加者14名

10:30-12:00 ヘモグロビンの純度検定(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)

13:00-15:00 純度検定およびヘモグロビン結晶の観察とルミノール反応

15:00-16:00 キャンパスおよび生物化学研究室の見学

試薬と溶液の組成

1. ヘモグロビン結晶化

- ・ウシ血液(東京芝浦臓器株式会社)
- ・生理食塩水:0.85%NaCl
- ・ジエチルエーテル:市販品原液
- ・エタノール:市販品97%

2. SDS-PAGE

- ・ゲル緩衝液:1.5M Tris-HCl/0.4% SDS, pH8.8
- ・アクリルアミド溶液:18%T Acrylamide
- ・泳動緩衝液:50mM Tris/384mM グリシン/0.1% SDS
- ・2xS 溶液:125mM Tris-HCl/4% SDS/20% glycerol, pH6.8
- ・染色液:0.05% CBB/50% MeOH/7% AcOH
- ・7%酢酸:7% AcOH
- ・脱染色液:20% MeOH/7% AcOH
- ・過硫酸アンモニウム溶液:2%
- ・TEMED:原液

3. ルミノール反応

- ・ルミノール試薬 使用直前に下記の2つの試薬を混ぜる
- 0.1%ルミノール/0.1MNaOH 0.2ml
- 3% H_2O_2 (市販過酸化水素水10倍希釈液) 1ml

手順0

- ・白衣を着てください。
- ・2人でグループになってください。
- ・アイスボックスに氷を用意してください。

1日目

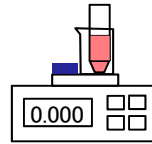
手順1: 血球の遠心分離

・グループごとに遠心チューブを一本用意する。

・ウシの血を駒込ピペットで1本の遠心チューブの35mlの目盛まで入れる(粘稠なのでゆっくりと)。

・遠心チューブとフタを電子天秤にのせ、「0.000」にリセットする。

・別のグループの遠心チューブと交換し、血を加減して $0 \pm 0.1\text{g}$ の範囲になるように重さを調整し、バランスをとる。



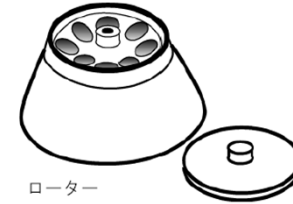
遠心チューブにはサインペンで自分の目印を付けておくこと

手順2: 血球の遠心分離

・バランス合わせが終わった遠心チューブのフタを締める。

・チューブを遠心機のローターの孔に対称になるように入れる。

・ 4°C 、 $5,000\text{rpm}$ で5分間遠心分離する。



ローター
遠心分離機の中にセットされている。

手順3: 血球の洗浄

・透明な上澄みを駒込ピペットで1.5mlチューブに0.5mlほど分け取る(名前を書いて保存)。

・残りの上澄みを廃棄する。

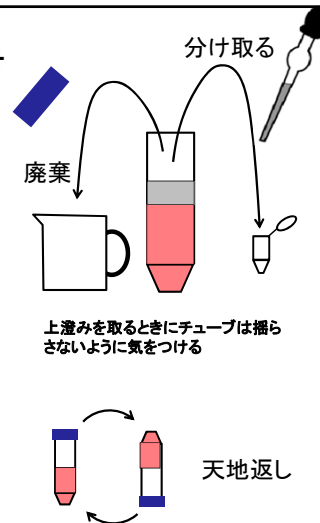
(1) 生理食塩水を20ml加える。

(2) フタをして2-3回天地返して、沈殿(赤血球)と生理食塩水を混ぜる。

(3) バランスを取って 4°C 、 $5,000\text{rpm}$ で5分間遠心する。

(4) 上澄みを廃棄する。

(5) (1)~(4)をもう一回。



上澄みを取るときにチューブは揺らさないように気をつける

天地返し

手順4: ヘモグロビン抽出

・13mlのところまで、上澄みを駒込ピペットで廃棄する(赤血球を少し捨てて良い)。

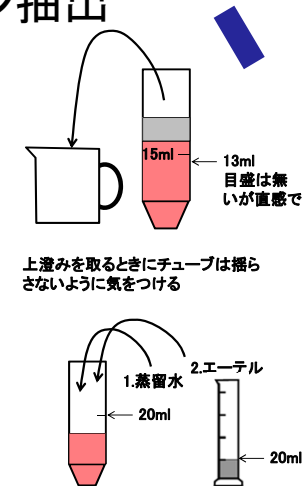
・冷やした蒸留水を20mlの目盛まで(約7ml)加える。

・チューブにフタをして数回天地返して、沈殿(赤血球)と水を混ぜる。

・ドラフト内で、ジエチルエーテルを20mlメスシリンダーではかり、溶液に加える。

・チューブにフタをして混合液を激しく混ぜる。

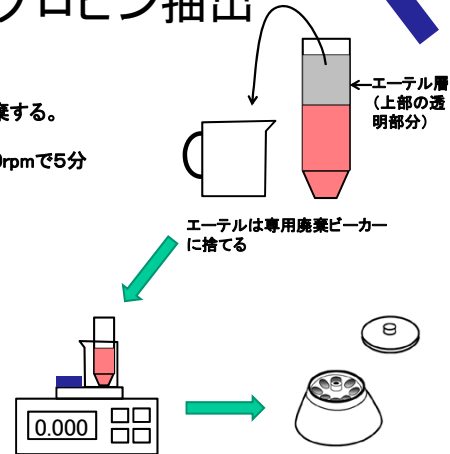
・氷上で10分間静置。



上澄みを取るときにチューブは揺らさないように気をつける

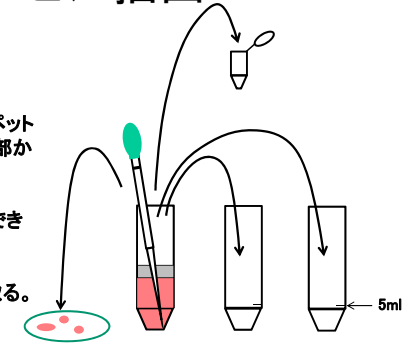
手順5:ヘモグロビン抽出

- ・ドラフト内でエーテル層を廃棄する。
- ・バランスを取って4℃、5,000rpmで5分間遠心する。



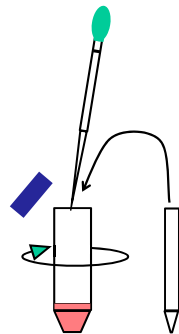
手順6:ヘモグロビン抽出

- ・遠心が終わったら、パスツールピペットをチューブの底まで突っ込んで、底部から溶液を回収する。
- ・遠心チューブ2本にそれぞれ5ml(できるだけ正確に)回収。
- ・1.5mlチューブにも0.5ml程度分け取る。
- ・パスツールピペットに残った赤色の溶液(ヘモグロビン溶液)をろ紙に滴下する。



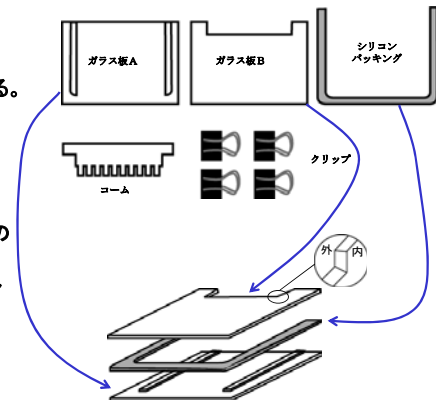
手順7:結晶化

- ・氷水と新しいパスツールピペットを準備する。
- ・遠心チューブを氷水につけ、振り混ぜながら、5-10分かけて、冷エタノールをゆっくりと加える。
- ・2本のチューブのうち、一方には2.3ml加え、もう一方には1.25ml加える。
- ・加え終わったら、フタをして冷蔵庫で翌日まで保存。



手順8:ゲル板組み上げ

- ・SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動用の器具5点を確認する。
- ・ガラス板Aの上にシリコンパッキングを載せて、その上にガラス板Bを重ねる。
- ・ガラス板Aのスペーサー(2本の出っ張り)とガラス板Bの間にパッキングが挟まると液が漏れるので注意する。



手順9:ゲル板組み上げ

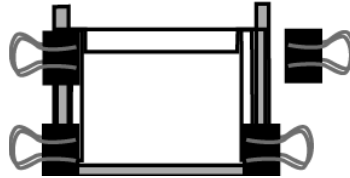
・組み立てたガラス板セットをずらさないようにクリップで留める。

・クリップの荷重は、ガラス板のスペーサーにかかるようにする。

・下の2つのクリップはガラス板の下端に合わせ、そのまま垂直にたてられるようにする。

・コームを試しにさして見る。

・出来上がったらスタッフの確認を受ける。



手順10:ゲル溶液調製と重合

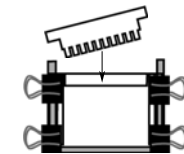
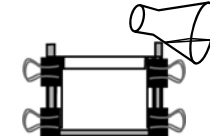
・次の液を50 ml 遠心チューブ中で混合する(冷やしちやダメ!)。

ゲル緩衝液溶液	2.5 ml
アクリルアミド溶液	7.0 ml
過硫酸アンモニウム溶液	0.5 ml
TEMED*	0.01 ml

*TEMEDを入れると急激に重合が始まる。ゲル板や試薬溶液の準備が整ってから、最後にTEMEDを入れて、直ちに溶液をゲル板のすきまに流し込む。

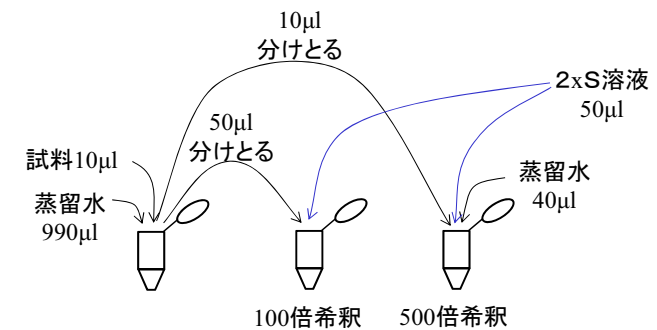
・コームをさし込む。斜めにさし込むと泡が入りにくい。

・翌日まで保存。



2日目

手順11:試料調製



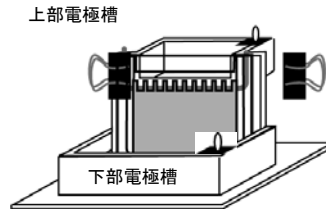
・血漿と溶血液をそれぞれ水で100倍と500倍に希釈。この溶液50µLをマイクロチューブに取り、等容の2×S溶液を加えて4種類の試料を調製する。

手順12:電気泳動

・ガラス板からコームを抜き、シリコンパッキングを取り除きクリップをはずす。

・泳動槽の下部電極槽に泳動緩衝液を7分目まで入れ、支持用のガラス板ごとゲルを電気泳動槽にクリップですえ付ける(切り込みのあるガラス板Bを上部電極槽の方に向ける)。このとき、ゲルの下端に気泡が入らないように注意する(入ってしまったら、教員を呼ぶ)。

・上部電極槽に泳動緩衝液を8分目まで注ぐ。

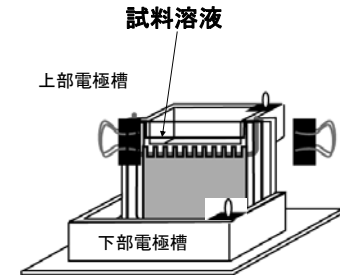


手順13:電気泳動

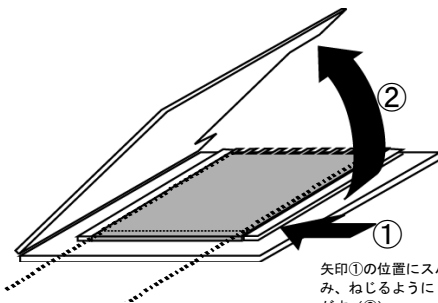
・試料溶液を15 μ Lずつ試料溝に注入する(スタッフのやり方をよく見て、まねること)。

・試料を入れ終わったらスタッフを呼んでください。通電します。

・色素のラインがゲルの下端から5mmに達したら、電流値を0にして、電源スイッチをOFFにして通電をやめる。



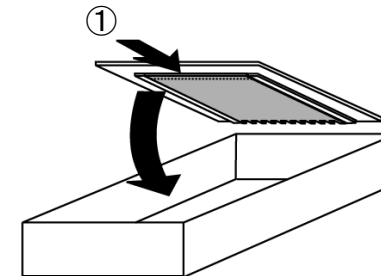
手順14:ゲル板解体



点線に沿ってゲルの下側から上に向かってゲルとガラス板の間を切り離すと剥がしやすい。

矢印①の位置にスパチュラを差し込み、ねじるようにしてガラス板を剥がす(②)

手順15:ゲル板解体



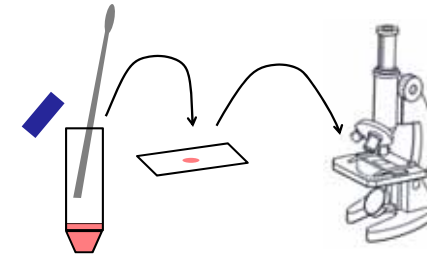
矢印①の位置からスパチュラをそっと差し込み、ゲルを染色ケースの中に落とす。CBB溶液をゲルが浸るまで入れる。染色中、脱染色中は時折揺り動かすと均一に染まる。

手順16:ゲルの染色

- 15mlのCBB溶液(Coomassie Brilliant Blue, 50% MeOH/7% AcOH溶液)浸して15分間染色する。
- CBB溶液を捨てて、20mlの20%MeOH/7% AcOH溶液で30分間脱色する。
- 溶液を捨てて、さらに20mlの20%MeOH/7% AcOH溶液で90分脱色する。

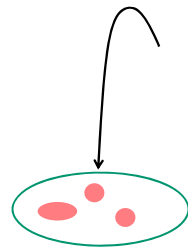
手順17:ヘモグロビン結晶の観察

- ヘモグロビン結晶をミクروسパーテルすくいとって、スライドガラスに塗りつける。
(カバーガラスをつけたほうが見やすい)
- 顕微鏡で観察(接眼10x対物4=40倍)。



手順18:ルミノール反応

- ヘモグロビン溶液を滴下したろ紙に暗所でルミノール試薬をかけてみよう。

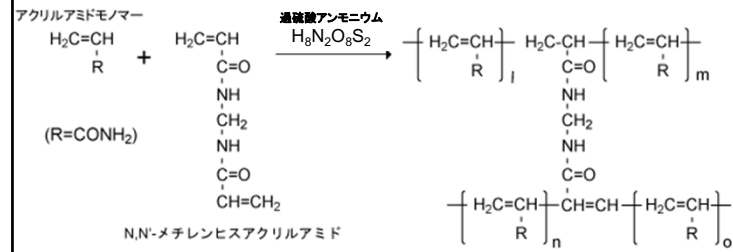


SDSによるタンパク質の変性



ポリペプチドにはSDSが吸着してランダムコイル状になる

ポリアクリルアミドゲルの重合反応



SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動の原理

