

化学生命理工学実験 II

アフィニティークロマトグラフィー（藤原・砂長担当）

PowerPoint 資料の補足

PowerPoint 資料（1）に出てくる難しい用語などを、ごく簡単に解説します。

実験操作の原理や目的、各段階で予想される結果などを詳しく勉強したい人は、キーワードを自分でネット検索するなどして、しっかり勉強しておくこと。わからないことは、気軽に質問に来ること。

【注 1】 mCherry

Discosoma 属の造礁サンゴ由来の蛍光タンパク質 **Ds-Red** の改良版。

540～590 nm（緑色）の励起光を吸収し、550～650 nm（緑～赤）の蛍光を発する。

励起光と区別するため、通常は赤い波長の蛍光を検出する。

参考資料：<https://en.wikipedia.org/wiki/MCherry>

【注 2】 mCherry タンパク質の発現誘導

mCherry 遺伝子は、人工的に作られたプラスミドに組み込まれている。*mCherry* 遺伝子を発現させるプロモーターには、*lac* リプレッサーの結合配列（オペレーター）が重ねられている。そのため、ラクトースの類似体（イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド、略して IPTG）によって発現を誘導することができる。この実習では詳しいことを理解する必要はない。

参考資料：<http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~tatataa/tech2018/gene/expression.html>

【注 3】 10000 ×g

遠心力のこと。「g」は重力加速度。10000 ×g は、重力加速度の 10000 倍のこと。

ちなみに遠心機で回転させたときに、チューブにかかる遠心力（×g）は以下のようにして求める。

$$[\text{遠心力 (×g)}] = 11.18 \times [\text{回転数 (rpm)} \div 1000]^2 \times [\text{回転半径 (cm)}]$$

【注 4】 Lysozyme (リゾチーム …英語ではライソザイムと読む)

大腸菌の細胞壁を分解する酵素。この酵素で処理せずに超音波を浴びせても細胞は破裂しない。

【注 5】 Lysis Buffer

水溶液の作り方については2つめの PowerPoint ファイルを参照のこと。

【注 6】 DNaseI

DNA 分解酵素 (エンドヌクレアーゼ)。

大腸菌の細胞を超音波破碎すると、細胞内の DNA や RNA, タンパク質などが水溶液中に溶け出してくる。大腸菌のゲノム DNA は非常に長い (約 4 Mb) ので、元の細胞数に対して水溶液の量が少なめだった場合、溶菌液がネバネバになる。そのような場合に、DNaseI で溶液を処理することによって、溶液の粘性を下げ、以後の実験操作を容易にすることができる。

【注 7】 Ni²⁺-NTA ビーズ

3つめの PowerPoint ファイルを参照

【注 8】 溶菌液の遠心分離後の上清

超音波破碎し、遠心分離をした後には、可溶性のタンパク質 (元々大腸菌の細胞質内に漂っていたタンパク質) は上清に残る。これに対して、細胞膜や細胞壁の断片は遠心によってチューブの底に沈殿する。当然のことながら、細胞膜あるいは細胞壁に結合したタンパク質は底に沈殿する。mCherry は可溶性タンパク質なので、上清にあるはず。

ただし、大腸菌の細胞に、外から遺伝子を導入して、人為的に強制的にタンパク質を発現させた場合、もしもそのタンパク質の量が多すぎたりすると、インクルージョンボディと呼ばれる不溶性の塊ができてしまい、遠心後の上清に目的のタンパク質がほとんどないような状態になることがあるので注意が必要。

【注 9】 SDS-サンプルバッファー

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のためのサンプルを溶かすバッファー。

この実習では 2 倍濃度のものを使う。組成は以下の通り。

詳しくは杉山先生担当の実習で教わろう。

20% (weight/volume) グリセリン

10% (volume/volume) 2-メルカプトエタノール

4.6% (weight/volume) ドデシル硫酸ナトリウム

125 mM Tris-HCl (pH 6.8)

ごく少量 (濃度はお好みで…) のブロモフェノールブルーで青い色をつける

【注 10】 タンパク質と Ni²⁺-NTA ビーズとの混和作業

何のためにやるか、この過程で何が起こるかなどを理解することは、この実習ではきわめ

て重要。3 つめの PowerPoint ファイルをよく読んで、理解すること。