

第3節 SDS-PAGE 法ならびにウエスタンブロット法による分析

【目的】 SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) の原理を学ぶとともに、ダイズ種子タンパク質の分析を行う。また、タンパク質の高次構造を保つために重要な役割を果たしているS-S結合を、還元処理の有無によるダイズ 11S グロブリンの泳動の違いから検出する。さらに、ウエスタンブロッティングを行い、免疫学的手法によるアミラーゼの検出を行う。

3.1 SDS-PAGE法

【安全上の注意】 通電中は感電の恐れがあるので、泳動槽にフタをすること。

【材料】 試薬や器具については第1章第4節参照。

【実験】

- 1) 大豆粗抽出液 50 μL に 10 μL の SDS 処理液を加え、100 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分間加熱する。還元処理を行うサンプルについては、2-メルカプトエタノール($\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)を含む SDS 処理液を添加する。タンパク質染色用とウエスタンブロット用の 2 枚泳動する。
- 2) 泳動ゲルを泳動槽にセットし、上記で調製したサンプルを 1 レーン当たり 10 μL ずつマイクロピペットを用いて注入する。添加する順序は、左から、①粗抽出液(還元)、②素通り画分(還元)、③カラム精製画分(還元)、④11S グロブリン画分(還元)、⑤分子量マーカータンパク質、⑥11S グロブリン画分(非還元)。
- 3) ゲル1枚当たり 40 mA で約1時間泳動(プロモフェノールブルーの青いラインがゲルの先端から 1 cm くらいにくるまでが目安)。
- 4) コテを用いてガラス板をこじ開け、ゲルをクマシーブリリアントブルー溶液の入ったプラスチックケースに移す(ウエスタンブロット分析用のゲルの処理については「ウエスタンブロット法」の項を参照)。
- 5) 30 分程度染色後、脱色を行う。完全に脱色するには1夜必要。

3.2 ウエスタンブロット法

【原理】 電気泳動により分離されたゲル中のタンパク質を、そのままの相対位置を維持したままメンブレンに電氣的に転写する操作。転写装置には、緩衝液中で行うウェット式と、ろ紙にはさんで行うセミドライ式があるが、ここでは後者を用いる。なお、DNA、RNA を転写する操作はそれぞれ、サザンブロッティング、ノーザンブロッティングとよばれる。転写されたメンブレンに対して、それ以上余分なタンパク質が吸着するのを防ぐためブロッキング処理を行った後、特定のタンパク質(ここではアミラーゼ)を認識する一次抗体を反応させる。非特異的にメンブレンに吸着した一次抗体を洗浄により除去した後、二次抗体(一次抗体を作製した動物の IgG の不変領域を認識する抗体に、アルカリホスファターゼなどの酵素を結合したもの)を反応させる。一次抗体の場合と同様に、洗浄により非特異的に吸着した二次抗体を除去後、基質液を加えて酵素反応を行いその検出を行う。

【安全上の注意】 発色液中の NBT、BCIP は有毒なので、防護手袋をして取り扱う。またメタノールも有毒。これらは実験のあと所定の容器に捨てて保管。抗体液やブロッキング液には、場合

によっては有毒なアジ化ナトリウムが添加されていることがあるので、取り扱いに注意する。

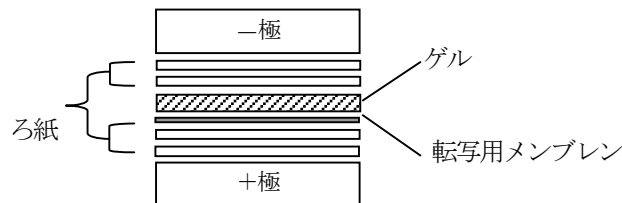
【試薬】

- 転写緩衝液：20%メタノールと0.02% SDSを含む0.1 M トリス-192 mM グリシン緩衝液
 - ブロッキング液：5%スキムミルク含むPBS-T(0.05% Tween 20を含むPhosphate Buffered Saline)
 - 抗体液：一次抗体液（大豆アミラーゼに対するウサギ抗体）、二次抗体液（ウサギIgG認識ヤギ抗体にアルカリホスファターゼを結合したもの）
 - 洗浄液：PBS-T
 - 発色反応試薬：ニトロブルーテトラゾリウム溶液（NBT, 5 mg/mL）、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸 *p*-トルイジン酸溶液（BCIP, 50 mg/mL）、発色用緩衝液（100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂を含むpH 9.5の100 mM トリス塩酸緩衝液）
- その他：メタノール（メンブレン処理用）、10% 酢酸（アルカリホスファターゼ反応停止用）

【器具】セミドライ型転写装置、ナイロン手袋、転写用メンブレン、ろ紙、ピンセット、プラスチックケース

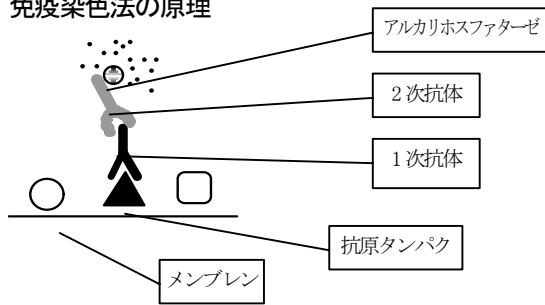
【実験】

- 1) 上記の操作'4'で泳動を終了したゲルを、転写緩衝液を入れたプラスチックケース移し、10分程度ゆっくり振とうしながらゲルの平衡化を行う。
- 2) 上記の操作と平行して、転写用ナイロンメンブレンを数秒間メタノールで処理後、転写緩衝液に10分程度浸す。
- 3) ろ紙を2枚ずつ転写緩衝液に浸し、ろ紙とメンブレンとゲルを以下のように重ねる。メンブレンの表裏がわかるようにボールペンでしるしを付け、ゲルの切れ込みが左下になるように置く。このとき、空気を挟み込まないように注意。メンブレンやゲルを直接さわらないようにナイロン手袋をはめること。



- 4) ゲル1枚あたり60 mAで90分間転写する。
- 5) メンブレンをピンセットを用いて取り出し、ブロッキング液の入ったプラスチックケースに浸す（30分以上）。
- 6) 希釈した一次抗体と1時間以上反応させる。
- 7) 洗浄液で10分間ずつ3回洗浄する。これはメンブレンに非特異的に吸着している一次抗体を完全に除去するために行う。
- 8) 二次抗体と30分以上反応させる。
- 9) 洗浄液で10分間ずつ3回洗浄する。これはメンブレンに非特異的に吸着している二次抗体を完全に除去するために行う。
- 10) 発色試薬に入れ換え、青紫色のバンドが見えるまで静置（通常、数分から15分くらい）。あまり長く反応させすぎると、メンブレン全体が着色し、バンドが見づらくなるので注意。

免疫染色法の原理



3.3 分子量の検定

【実験】

- 1) ゲルやメンブレンの像を、デジタルカメラで撮影するかスキャナーを用いてパソコンに取り込む。場合によっては（バンドが薄くて見づらい場合など）、適当な画像処理ソフトを用いてバンドを見やすくする。
- 2) 分子量マーカーの各バンドの位置を泳動ゲルの上端から正確に測る。
- 3) 片対数グラフの横軸に移動距離を、縦軸に分子量をそれぞれのマーカーについてプロットする。このとき縦軸が対数目盛りであることに注意。
- 4) 各点をできるだけなめらかにつなぐ。これが検量線となる。
- 5) 分子量を求めるタンパク質バンドの上端からの移動距離を正確に計り、その値を検量線を書いたグラフの横軸にプロットし、その点から横軸に垂直に線を引き、検量線と交差した点の分子量を縦軸から読み取る。これが求めるタンパク質の分子量となる。