

## 実験5 生化学分析入門

### 【実験 5(A)】免疫分析

注)実験 5(A) では実験操作に入る前に設問に答える必要がある。

事前に設問 5(A). 3. 2 (7) の設問に解答を準備すること。

#### 5(A). 1: 解説

##### 5(A). 1. 1: 免疫分析の概要

様々な成分を含む試料の中から目的とする成分だけを識別し、かつその成分の濃度や量を知るために、これまでの実験では錯体の形成や溶媒抽出など、ある化学種に選択的な化学反応を利用してきた。このような分析法は、目的とする化学種に対する化学的親和性を利用した分析法と考えることができよう。一方、生体内では膨大な種類の化学種の中からある特定の化学種に対して非常に高い選択性で化学反応が進行し、しかも膨大な数のこのような化学反応が誤りなく秩序だてて繰り返されている。こうした化学反応系が誤りなく進む要因の一つとして、生体成分や組織などが特定の化学種に対して優れた分子認識機能を備えていることがあげられよう。さきに述べた化学的親和性に対して生体成分や組織などが持つこのような分子認識機能を生物学的親和性と呼ぶことがある。

生体成分の有力な分析法の1つに抗原抗体反応を利用した免疫化学的測定法、即ち免疫分析法がある。ここで、抗原抗体反応は生物学的親和性に基づく反応といえることができる。生命工学 (bio-technology) の手法が工業的規模の生産に利用されるようになり、機能性タンパク質や生理活性物質など製薬や食品工業を筆頭に、生体に作用する物質の製造と管理が日常的に行われている。また、生化学や医学、臨床検査の分野においても、微量な生体成分の高感度分析は不可欠な分析手法である。このような分析に免疫分析が広く利用されており、分析化学の重要な一分野である。

ここで学ぶ酵素免疫測定法 (EIA: enzyme immunoassay または ELISA: enzyme linked immunosorbent assay) とラテックス凝集法も、免疫分析法の1つである。抗原抗体反応は、特異性が高いことと、抗原と抗体との間の結合定数が大きいことが特徴である。抗原抗体間の特異性は、例えば抗原がペプチドの場合はアミノ酸1つの違いを、さらに、後で説明する低分子抗原 (ハプテン: hapten) では1つの官能基の配置の違いさえ識別することが可能である。タンパク質をはじめ様々な物質の複雑な混合物である血清や尿を試料として目的とする成分を分析する場合、通常の化学的親和性を用いた化学分析法では、分離精製などの複雑な前処理操作が必要になる。しかし、このような場合に免疫化学的測定法を用いると、抗原抗体反応の特異性により分離精製など前処理操作の多くの過程が省略でき、簡易な測定が可能になる。抗原抗体間の結合定数は対象とする抗原などにも依存するが、大きいものは  $10^{10} \sim 10^{11}$  にも及び、他の特異的結合、たとえば酵素・基質、ホルモン・レセプターなどとの間の結合定数より大きい場合が多い。これらの特色により、複雑な分離精製操作を必要としないばかりか、免疫分析法では多くの方法で ng ~ pg の感

度が得られる。

この実験では、免疫反応のしくみについて基礎的な事項を学び、EIA とラテックス凝集法について実習する。免疫分析法の特徴を体験し、通常の化学的親和性を利用した分析と生物学的親和性を利用した分析法との違いを考察することを目標とする。

#### 5(A).1.2:免疫分析法の原理と基礎

(1)免疫反応:免疫反応は、生体防御機構の一つとして知られている一連の諸現象を意味する。抗体産生は免疫反応の一つであるが、基本的には免疫系にとって性質を異にする、すなわち異物とみなされる物質が存在することに対して起こる生体反応である。複雑な免疫反応が広く脊椎動物全般において見られ、特に哺乳動物において顕著である。免疫、すなわち病原体などの免疫原 (immunogen: 免疫原とは免疫系を刺激するもの) による免疫反応の刺激に続いて、図1に示すように B リンパ球によって産生された抗体は血液系を循環し、数週間から数カ月もの寿命を保持する。抗体は抗原を攻撃し(結合し)活性を奪う。ワクチンが代表的な応用例である。免疫した血液から採取した血清を「抗血清」という。抗血清は全血清蛋白の1%程度に相当する少量の抗体を含んでいる。

免疫原及び抗原 (antigen) は、それぞれ、免疫反応を刺激するもの、及び免疫学的に抗体と反応するものとして区別される。同じ分子が免疫原および抗原の両方として作用する場合もあるが、常に必ずしもそうであるわけではない。分子量がおよそ 5000、あるいはそれ以上のタンパク質やペプチドは、免疫原として作用する。一般に免疫反応を引き起こすのに必要とされる最小分子量は 5000 程度といわれている。最適な免疫反応を引き起こすためには、ある動物種から得た免疫原を系統発生的に見て、遠く離れた異種動物に免疫する必要がある。例えばヒトのタンパク質に対する抗体が必要な場合には、ウサギまたはヒツジを免疫することになる。この場合、ヒト IgG に対する抗体をウサギで生産するとウサギ 抗ヒト IgG 抗体というように表記する。

それ自体では免疫原性のないステロイド、ペプチド、薬物およびヌクレオチドのような低分子物質に対しても、その物質を免疫原性のあるものと結合させると免疫原性を持つようになる場合がある。こうして生産された抗体の中には遊離の低分子

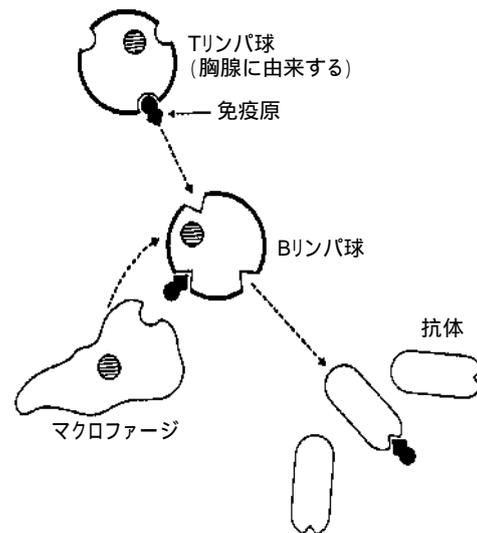


図1 免疫反応の細胞学的基礎

抗原が細胞表面上の特異的な結合受容体と反応すると、特異Bリンパ球は刺激を受けて特異免疫グロブリン(抗体)を分泌し、多数に分裂して増殖する。同様に表面受容体を介して、免疫原と反応するTリンパ球からもBリンパ球は適切かつ効果的な刺激を受ける。マクロファージ (macrophage) も免疫原と反応して、特異Bリンパ球を刺激する。

物質に結合するものもある。この場合、遊離の低分子物質はハプテン、抗体はハプテン抗体と呼ばれる。

ハプテンを免疫原性をもつ担体 (Carrier) と共有結合させるためには、ハプテンがアミノ基 (-NH<sub>2</sub>) やカルボキシル基 (-COOH) のような、反応性に富む官能基を持っていないと、官能基がない場合には、官能基をもつ類似化合物に誘導体化する必要がある。類似化合物とハプテンの構造がある程度同じであれば、類似化合物に対して作製された抗体はハプテンともよく反応する。免疫分析はこのような免疫反応を利用した分析法であり、多くの場合、抗体を特異試薬として抗原を定量する。抗ハプテン抗体を用いることにより免疫分析は疾病などに関連する生体関連物質に限らず、広い範囲の化学物質に応用することができる。

(2) 抗体分子: 免疫分析に不可欠な要素は、体内で産生される抗体分子である。抗血清中に存在する抗体は、通例分子量が 150,000 ダルトン (dalton) 以上の大きな分子である。抗体は免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig と略す) に属するタンパク質である。免疫グロブリンは、例えば、IgG、IgA、IgM、IgD、および IgE のような、アルファベットで表される多くのクラス (class) に分類される。多くの免疫分析に使用される抗血清は、主として IgG、IgM であり、IgA のようなクラスの抗体を使うこともある。

ほとんどの抗体は図2に示すような基本構造をしている。抗原との結合部位 (binding site) は可変領域 (variable region) にある。定常領域 (constant region) および可変領域は、ある1つの決まったクラスの免疫グロブリンの中でアミノ酸配列が一定である部分と、変わる部分を示している。この可変領域でアミノ酸配列が変化することによって、抗原結合部位に種々の特異性と多様性がもたらされる。したがって、抗原結合部位のアミノ酸配列とその部分の三次元構造によって、1つのクラスのグロブリンでも 10<sup>10</sup> (100 億) もの異なる抗原結合部位をつくり得る可能性のあることが計算上では示されている。つまり、これだけの数の異なる構造の抗原を識別することができる (特異性がある) わけであり、その1つ1つが分析試薬に相当することになる。

免疫分析の特異試薬である抗体の性能は、分析そのものの性能を大きく左右する。

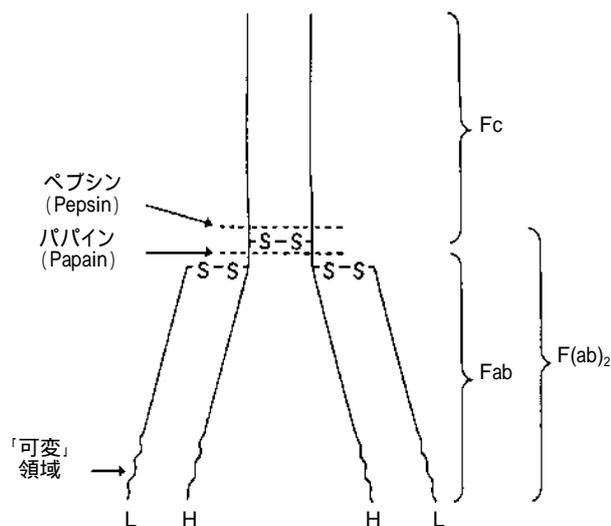
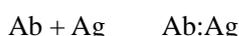


図2 IgG の基本構造 分子は2本の長鎖、すなわちH鎖 (heavy chain) と2本の短鎖、すなわちL鎖 (light chain) とから構成されている。ペプシン (pepsin)、あるいはパpain (papain) などの蛋白分解酵素を使って切断すると、F(ab)<sub>2</sub> もしくは Fab、および Fc フラグメントが生成する。「可変領域」には抗原結合部位が存在する。

つまり、特異性と親和定数( $K$  値)の高い抗体を使用することによって、アッセイ(assay)の特異性が改善され、感度は上昇する。免疫分析でもマスキングなど通常の化学分析の試薬に相当する多くの試薬類を用いるが、抗体の品質は他のいかなる試薬類の品質よりも、より直接的に免疫分析の性能に関連している。

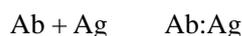
(3) 免疫分析: 免疫分析は、要するに免疫試薬、つまり抗体の特異的反応を利用してある物質を分析することである。この場合の分析は Assay(アッセイ)であり、定性(何が)および定量(どれだけ)の両方が含まれている。反応の初期には抗体(Ab)と抗原(Ag)が結合して複合体(complex; Ab:Ag)を形成する。つまり、



となる。この反応は可逆的なので、複合体の解離も起こる。複合体の形成が増大するにつれて、解離する量も増大する。つまり、



となる。ある程度の時間が経過すると正味の結合量は、同量の解離が起こって相殺されるようになり、免疫反応は一般の化学反応と同様に平衡状態に達する。つまり、



となる。抗体の抗原に対する親和力(affinity)は、複合体を形成している抗体と抗原の間の結合の強さの指標である。親和力が高ければ高いほど、平衡状態でより多くの抗原と抗体が結合していることになる。多くの場合、抗体と抗原との間の親和力は前述したように非常に高い。

アッセイとは「何が、どれだけ?」という問いに、答えることである。抗体には非常に高い特異性を示す能力があるので、問いの「何が」を明らかにする目的には理想的と言ってよいほど適している。問いの「どれだけ」を明らかにする場合、抗体を使用するアッセイ法をふたつの方法に分類することがある。この分類は抗体(特異試薬)を限られた濃度で使用するか、あるいはまた過剰に使用するかに基づいており、抗体量が限られている場合には「イムノアッセイ(immunoassay)」、過剰な場合には「イムノメトリックアッセイ(immunometric assay)」とよばれているが、免疫分析の専門的な研究分野以外ではそれほど一般的ではない。これは通常の化学分析では、ほとんどの場合試薬を大過剰で用いるが、免疫分析では、一般的に抗体が大変高価であるため、小過剰で用いる場合はあっても大過剰で用いることは少ない。よって各々の場合の特性を明らかにするために区別していると考えてよい。このことは、試薬量が限られていることが免疫分析の特徴の一つであることを物語っている。一般的にはいずれの場合でもイムノアッセイで包括的に表現している。

大過剰量の試薬、つまり抗体を使用できる場合は通常の化学分析と大きな違いはない。測定しようとする抗原濃度が抗体量に比べて十分低い場合には、その上昇にともなって結合型抗体は正比例して変化する。この場合の本質的な特徴を図3の(i)に示す。過剰とは抗体のモル濃度が、予想している抗原のモル濃度よりも高いという意味である。しかし、免疫分析の場合は一般の化学分析のように大過剰であるわけではない。したがって、この図の(ii)に示すように、抗原と抗体量が等しくなることもあれば、後述するように逆転することもあり得る。大部分の化学分析法では重要

な試薬が過剰に存在するという点に対し、免疫アッセイのこの特徴は分析化学では例外的である。

抗体と抗原の正味の結合および解離がそれ以上起こらない、つまり平衡状態まで反応させると、図3の矢印の右側に示した状態に到達する。いずれの場合でも、抗原と抗体の結合した結合型分画 (bound fraction)、および抗体か抗原いずれかが結合していない遊離型分画 (free fraction) が混在することになる。結合型と遊離型はそれぞれ頭文字を取って B 及び F と略記される。

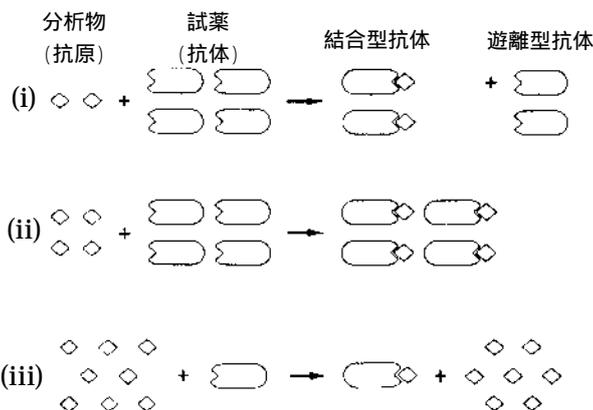


図3 抗原 抗体反応における試薬濃度比の違いと、平衡時に反応系に存在する化学種の違い  
抗原濃度が上昇すると、それに対抗して結合型抗体が増加する。

(4) 遊離型と結合型分画の分離 (B/F 分離): 一般に免疫分析では抗原の濃度を求めるが、抗体が試薬に相当するために抗原と抗体が結合した結合型分画 B の濃度を求めることになる。免疫分析における試料調製の手順で、結合型分画と遊離型分画との分離操作を B/F 分離と呼んでいる。分析対象を夾雑成分や過剰試薬などから分離するという意味においては通常の化学分析における溶媒抽出などの分離操作と同等に考えることができよう。

遊離型 F と結合型 B が混在していても簡単に結合型だけを定量できれば分析操作は大変簡単である。この場合、すなわち、アッセイの最終段階である測定のために、B と F を分離しないで反応溶液のまま定量する場合をホモジニアス法 (homogeneous method) と呼ぶ。ホモジニアス法では分析操作は単純で、分析時間も短い利点があるが、夾雑する種々の妨害要因により、一般的には低濃度の分析は困難になる。しかし、低濃度で精度良く抗原の濃度を知るためには、遊離型および結合型分画のいずれかを測定することになるが、これらふたつの分画が明確に分離すること、即ち B/F 分離が必要である。この場合をヘテロジニアス法 (heterogeneous method) と呼ぶ。B/F 分離には様々な方法が開発されている。よく用いられている物理化学的な分離方法を表1に示す。それぞれの方法には各々特有の長所と短所がある。免疫系はきわめて複雑であり、これらの長短所については必ずしも常に予測どおり当てはまるとは限らず、特定の抗体と抗原の反応に関する B/F 分離の選択については経験的な評価に基づくことが多い。

この実験では、ホモジニアス法の例としてラテックス凝集法を、ヘテロジニアス法の例として EIA を実習する。これらは、表1の固相試薬を用いる分離法に相当する。

表1 分離法

原理	方法	特徴
分子の荷電	電気泳動	分解した標識を含む妨害因子を除去することができる。
分子の大きさ	カラムグラフィー 吸着	例えば、炭末(charcoal)への小分子物質の非特異的吸着。
	拡散	一般に、二次抗体のような、他のシステムと併用される。
	濾過	
蛋白	蛋白沈殿法	ポリエチレングリコール(6000)もしくはアルコールを使用する。あまり特異的ではない。
免疫グロブリン	免疫沈殿法	二次抗体あるいは protein Aを使用する。一般に極めて特異的である。
その他	固相試薬	例えば、プラスチック表面、セルロース粒子あるいは、マグネットビーズを使用する。非常に特異的な場合がある。

(5) 定量: アッセイの「どれだけ？」に答えるためには、B/F 分離のある無しにかかわらず、結合型および遊離型分画のいずれかを定量する必要がある。そのため、抗原を定量する場合、何らかの「標識」を抗体に結合させ、その標識の量を測定する。例えば、ラテックス凝集法では、抗原あるいは抗体のいずれかを、微粒子に付着させておき、抗原と抗体が互いに反応した時に微粒子の凝集が起こることを測定する。ラジオアイソトープ (RI) のような、より検出感度の優れた別の「標識」を使用する場合には、免疫分析の感度は著しく良くなる。例えば、RI を標識した抗体を反応させると B/F 分離後の結合型分画に存在する結合体は全て RI で標識されているので、この分画の放射線量を測定してやればよいことになる。一般に RI の測定は単独原子核事象も検出できるため非常に高感度となる。また、酵素で標識した場合には、後で詳しく説明するが、B/F 分離後に酵素と基質を酵素反応させ、酵素反応量 (酵素活性) を測定して定量する事になる。表2に検出と測定に利用されている標識をまとめた。標識の種類はしばしば免疫分析法の最も重要な特徴であり、標識は免疫分析法を分類する時の根拠となる。例えば、ラジオアイソトープ標識の場合には、ラジオイムノアッセイ (RIA) となり、酵素の場合はエンザイムイムノアッセイ (EIA) となる。

表2 イムノアッセイ法において一般的に使用されている「標識」

---

沈殿物中の窒素含有
可視沈降線
赤血球
粒子
散乱光
ラジオアイソトープ
酵素
蛍光試薬
発光

---

(6) ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体: 今回の実験ではポリクローナル抗体を用いるが、通常の化学的親和性を利用する分析法で用いる分析試薬と抗体との類似性を理解するためにはモノクローナル抗体の考え方は重要である。ここではポリクローナル抗体とモノクローナル抗体について簡単に説明する。また、モノクローナル抗体の生産過程から、バイオテクノロジーによる有用タンパク質の工業生産が分析化学の分野でも重要な技術であることが理解されよう。

ある特定の免疫原に対して、免疫系により産生される個々の特異抗体は、もとは一個のリンパ球に由来する子孫によりつくられたものである。各リンパ球の子孫はある特定の抗体を産生するように、もともとリンパ球により遺伝的に定められた固有の能力をもっている。「免疫原・抗原・抗体」の対応を決める官能基を抗原決定基と呼ぶが、一般にどの免疫原にも多数の抗原決定基が存在するので、免疫によって多数の異なるリンパ球が刺激される。そのために一般の抗血清は常に一つの抗体と反応するだけでなく、様々な特異性と親和力を持つそれぞれ異なる抗体を含む不均質な混合物となる。また、抗血清は一般にいくつかのクラスの免疫グロブリンを含む混合物でもある。抗体の遺伝子発現は正常より高頻度に突然変異が起こっており、突然変異種 (mutant) によっても分子種がさらに不均質になることが明らかになっている。このように、ある免疫原に対する抗血清は様々な細胞に由来した抗体の混合物であるが、分析目標とする抗原との親和力はいちばん強く、その抗原には必ず作用するため、その抗原に対する抗体と呼ばれる。このようにして

生産された抗体をポリクローナル (polyclonal) 抗体と呼ぶ。当然予想されるようにポリクローナル抗体は目標とする抗原以外の抗原とも反応する。しかし、抗血清を高度に稀釈した場合には、つまり低濃度のところでは、実際には最も親和力の高い抗体のみが反応していることになる。このような条件下で高度に精製した標識抗原とともに使用すれば、不均質なポリクローナル抗体であっても、免疫分析においては均質な試薬と同様な働きをすると考えてよい。また、抗体の生産技術として高度に精製した免疫原を使って免疫をすることができ、さらに生産した抗原も精製して使えば、抗血清が不均質なために起こると考えられる問題点を実用上問題のない程度に少なくすることができる。

一方、最近単一細胞系から抗体を作製する技術が確立されている。このような抗体がモノクローナル抗体 (monoclonal antibody) である。リンパ球は培養するのが困難であったが、1975年、Kohler と Milstein は、特異リンパ球をミエローマ (骨髄腫; myeloma) 細胞と融合させることにより、in-vitro でも安定で、しかも培養可能なハイブリッド (hybrid) 細胞を生じることが示された。これらのハイブリドーマ (hybridoma) 細胞は、起源となったリンパ球により定められた特異抗体即ちモノクローナル抗体を生産し続ける。モノクローナル抗体を作製するための一般的な方法を図4に示す。

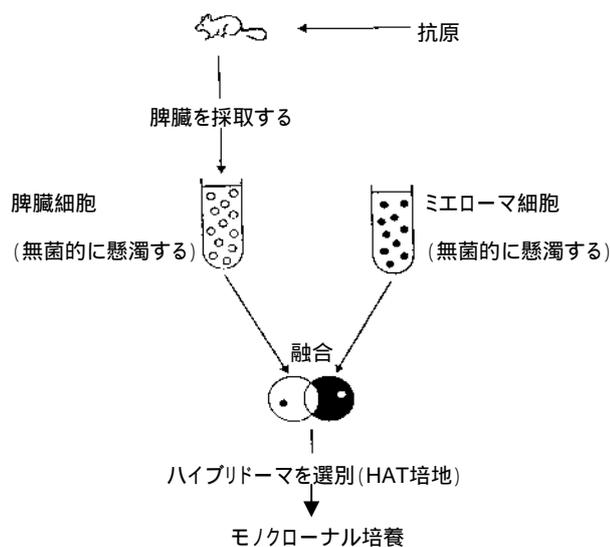


図4 モノクローナル抗体の製作

まず、従来より行われている免疫計画に従って、動物体内で B リンパ球を刺激しておく。リンパ球とミエローマ株 (myeloma strain) が適合することが必要であるが、良好なミエローマがマウスから得られていることから、免疫にはマウスが選ばれることが多い。免疫されたマウスが抗体を最も良く産生している時にこのマウスの脾臓をホモジナイズして活性リンパ球を含む細胞懸濁液を作製する。これまでに使用された融合試薬のうちで最も成功率の高いポリエチレングリコールを使用して、リンパ球とミエローマ細胞を融合させる。そして融合した細胞と、融合しなかったリンパ球およびミエローマ細胞を選別する。選別は HAT (Hypoxanthine-Aminopterin-Thymidine) 培地中で行われる。この培地は、ある種の酵素類が欠損している突然変異細胞 (mutant) であるミエローマにとっては本質的に有毒である。しかし、ハイブリドーマはリンパ球から遺伝的に受け継いだ酵素類を持っているので、その培地中で生き残ることができる。また融合しなかったリンパ球は培養液中では生存できない。培養によってハイブリドーマをこのように選別できることが、この方法が実際に成功した重要な過程である。生き残ったハイブリドーマを寒天培地内で増殖させ、単一細胞クローン化を行う。つまり、単一の細胞から分裂によって生じた細胞集団、即ちクローン (clones) を作製する。こ

これらのクローンをさらに培養して、その培地中に抗体が存在するか否かを調べる。陽性に出たクローンを再度クローン化して培養し、さらに検討を重ねる。培養中に有用細胞株を喪失してしまうことがあるので、それを避けるために陽性に出たクローンはどのようなものでも、通常その一部を液体窒素で凍結して保存しておく。

選別されたハイブリドーマの培養細胞は、それぞれもとはただ1個の細胞に由来するものである。あらかじめ遺伝的に定められた種類の抗体を産生するはずである。即ち、抗原決定基が一つだけであるから、分析対象となる抗原にのみ特異性をもつ抗体を得ることができる。凍結した細胞株は安定であり、適当な培地内で安定して増殖するので、永久的に抗体が供給されるものと考えられている。このことは常に一定の決まった特異性をもつ、ある特定のモノクローナル抗体がいつでも入手できることを示している。つまり、化学分析法で用いられる他の多くの分析試薬と共通した重要な特質を抗体も持つことができることを意味している。このようにして通常分析試薬と全く同様の高性能抗体を工業生産することができるようになった。しかし、上述したようにモノクローナル抗体の生産にはポリクローナル抗体とは比較にならない程の工程を要し、現状ではまだ非常に高価であり、慎重を要する分析、例えばある種の病気の診断や分析化学、生化学、医学生物学の基礎研究など、その用途は限られている。

今回の実験ではポリクローナル抗体を用いる。ポリクローナル抗体はモノクローナル抗体に比較すれば安価であるが、それでも通常の試薬に比べれば大変高価であるので、取扱は慎重にするよう心がけて欲しい。またポリクローナル抗体や標準抗原は抗血清や血清から作られるので、病原体などが混入する可能性があるが、これらの市販にあたってはきわめて厳重な検査が行われており、感染等の心配はない。それでも万全を期すために、他の有毒化合物と同様にゴム手袋の着用など取扱には十分注意を払い、実験に当たっては指導者の指示に従うこと。

### 5(A).1.3: 酵素免疫分析法

ヘテロジニアス EIA (以下 EIA と略記) の測定原理は、サンドイッチ法、競争法、抗体測定法、イムノエンザイモメトリー法など多数考案されている。この中で今回は、実用に供されている代表的な測定法の一つである抗原測定法のサンドイッチ法を実習する。サンドイッチ法では、酵素を抗体に結合した酵素標識抗体 (conjugate) と抗体を固相に結合した固相化抗体とを用いて測定系を組んでいる。サンドイッチ法の原理を図5に示した。抗体は2度使うが、一方の抗体は固相に結合させ、もう一方の抗体は酵素で識別する。固相化抗体・抗原・酵素標識抗体というように、抗原

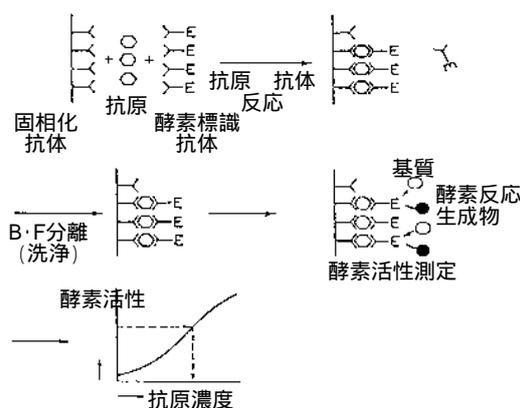


図5 1ステップサンドイッチ法の原

が抗体にはさまれたサンドイッチ状の複合体を1段階の抗原抗体反応で形成させ、固相上に免疫結合で吸着した酵素の基質との酵素反応量、即ち酵素活性を指標にして抗原量を求める方法である。

図5に示すように、固相化抗体および酵素標識抗体と、抗原とを同時に反応させると(図5- ), 抗原抗体反応により固相化抗体-抗原-酵素標識抗体の複合体を形成する(図5- )。

次に、未反応の酵素標識抗体などを洗浄によって B/F 分離し(図5- ), 酵素と基質とを酵素反応させて固相に結合した酵素標識抗体の酵素活性を測定する(図5- )。

このとき、試料中の抗原が少なければ複合体の形成量は少なく、酵素活性は低く測定され、逆に抗原の量が多ければ酵素活性は高く測定される。

このように既知濃度の標準物質を測定することによって検量線をつくり(図5- ), 試料の測定から得た酵素活性の値により抗原量を求める。

サンドイッチ法では、図5- のように、1つの抗原分子が固相化抗体と酵素標識抗体とに結合しなければ測定系は成立しない。このため原則的には、抗原分子は2つ以上の抗原決定基を持つ高分子物質でなくてはならない。また、前述したようにこの場合抗体量は抗原量に比べて通常わずかに過剰であるよう設定するので、図6(b)に示すように抗原過剰の場合、酵素標識抗体が過剰の抗原と反応するため、固相に結合する割合が減るいわゆる high-dose hook effect の現象が生じる。図6(b)に示すように、高濃度域の試料Dの測定では低濃度試料Aと同じ酵素活性が得られるため、誤った測定値を与えることになる。したがって、たとえば  $\alpha$ -フェトプロテインのような測定濃度域が極端に広い抗原の測定には適さないことがある。図6

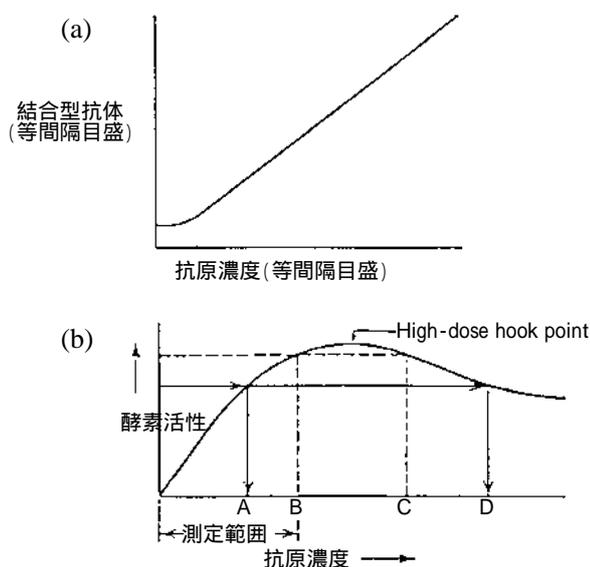


図6 等間隔目盛りと片対数目盛にプロットした、結合型抗体と抗原濃度との間の関係を示す曲線。

(b)から、酵素標識抗体の量を増せば、high-dose hook effect が生じる抗原濃度が高くなり、測定可能範囲も変化させることができる。今回はヒト血清中の IgG を定量する。

## 5(A).2:実験 酵素免疫分析法

### 5(A).2.1:実験A1.酵素免疫分析法

#### (1)実験の目的

この実験では、サンドイッチ法の EIA により代表的な抗原であるヒト IgG を定量する。ここで免疫分析に特有な High-dose hook effect を経験し、B/F 分離の有効性と欠点について考察する。なお、実験操作に設問5(A).3.2(7)の回答を必要とするため、実験に先立ち設問に対する答えを用意しておくこと。

#### (2)器具

マイクロタイター用比色計、恒温槽(37 )、冷蔵庫(5 )、攪拌器、ELISA 用マイクロタイタープレート(図8(左))、連続分注ピペット(図8(右))、マイクロピペット、試験管、試験管立て、

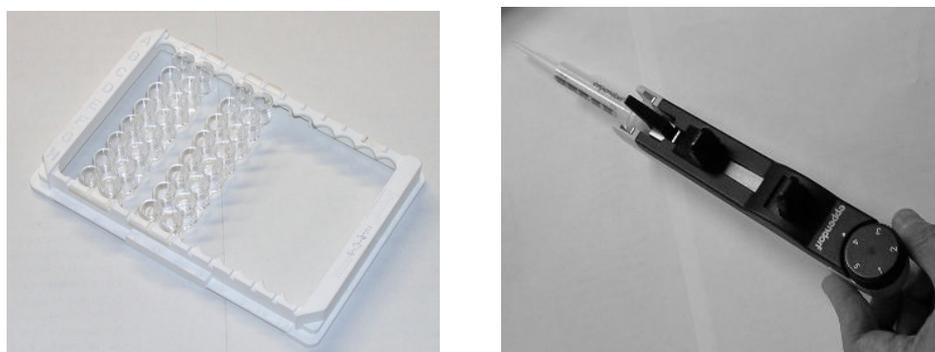


図8、ELISA 用マイクロタイタープレート(左)と連続分注ピペット(右)

#### (3)試薬

- 1) 0.1 M 炭酸緩衝液:炭酸ナトリウム 2.52 g と炭酸水素ナトリウム 8.4 g を水 1 L に混合する。
- 2) 1/15 M リン酸緩衝液 (PBS):リン酸2水素カリウム 2.73 g とリン酸1水素ナトリウム・12水和物 16.8 g を水 1 L に溶解し、塩化ナトリウムを最終濃度が0.08% になるように加える。この溶液の pH は 7.2 である。
- 3) 1/15 M リン酸 - Tween20 緩衝液 (PBS-T): PBS 溶液に濃度が 0.05% となるように界面活性剤 Tween20 を加える。
- 4) リン酸緩衝液 - 牛血清アルブミン溶液 (PBS-B):リン酸緩衝液(PBS)に牛血清アルブミンを最終濃度 1% になるように加え、泡がたたないように徐々に溶解する。
- 5) リン酸緩衝液 - Tween20 牛血清アルブミン溶液(PBS-TB): PBS-T 溶液に牛血清アルブミンを最終濃度 1% になるように加え、泡がたたないように徐々に溶解する。
- 6) クエン酸 - リン酸緩衝液:水 1 L にクエン酸 5.1 g およびリン酸1水素ナトリウム 12水和物 18.4 g を溶かす(pH 5.0)。
- 7) 抗ヒト IgG 溶液 (100 ppm):試験管に抗ヒト IgG 原液 (18000 ppm)をマイクロピペットで 22  $\mu$ L はかりとり、これに 0.1 M 炭酸緩衝液 4 mL を加えて良くふりまぜる。
- 8) ヒト IgG 溶液 (40 ppm):ヒト IgG 1 mg を 100 mL ビーカーにはかりとり、PBS-T 溶液 25 mL を

加えて良く混ぜる。

- 9) 抗ヒトIgG-ペルオキシダーゼ (HRP) 溶液: PBS-TB 溶液を用いて約 5000 倍に希釈する。
- 10) 基質溶液: o-フェニレンジアミン 60 mg を 100 mL ビーカーにはかりとり、これにクエン酸・リン酸緩衝液 20 mL を加え、スターラーを使用して溶解する。使用直前に 5% 過酸化水素水 100  $\mu$ L を加えて良く混ぜる。
- 11) 5% 過酸化水素水
- 12) 2 M 硫酸

#### (4) 実験操作

##### (操作1: 抗体感作)

抗ヒトIgG を ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) プレートに吸着させる。

- 1) 抗ヒトIgG (100 ppm) 溶液を2個の専用プレート (ELISA プレートという) に連続分注ピペットを用いて各々100  $\mu$ L ずつ各穴に分注し、37 °C の恒温槽中に1時間放置する。(以後、2 個のプレートを並列に操作する。)
- 2) ELISA プレートを裏返して勢いよく溶液を除去し、紙で表面の溶液を吸い取った後、これに PBS 溶液を 200  $\mu$ L ずつ全ての穴に連続分注ピペットを用いて分注し、この操作を 3 回繰り返す。
- 3) ELISA プレートを裏返して勢いよく PBS 溶液を除去し、紙で表面の溶液を吸い取る。これに PBS-B 溶液を 200  $\mu$ L ずつ全ての穴に連続分注ピペットを用いて分注し、ラップをかぶせ 5 日に一昼夜放置する。
- 4) 一昼夜放置後、2)と同様の操作を行い、ELISA プレートを洗浄する。

##### (操作2: 抗原抗体反応)

プレートに吸着した抗ヒトIgG にヒトIgG を反応させる。

- 5) ヒトIgG (40 ppm) 溶液を13本の試験管に PBS-T 溶液を用いて倍数希釈を行い各 1 mL に調製する。この溶液をマイクロピペットを用いて、ELISA 用プレートに、希薄溶液から順に 100  $\mu$ L ずつ分注する、この他に対照として PBS-T 溶液のみを1点とる。これにラップをかぶせ、37 °C の恒温槽中に 20 分間以上放置する。

##### (操作3: 酵素標識抗体の抗原抗体反応)

操作2で抗体に結合させた抗原に対して、さらに酵素で標識した抗体を結合させる。

- 6) ここまで用意した 2 個の ELISA プレートの内の一つに対して、ヒトIgG 溶液に抗ヒトIgG-HRP 溶液 100  $\mu$ L ずつを全ての穴に連続分注ピペットで分注し、ラップをかぶせ 37 °C の恒温槽中で 20 分間以上放置し、PBS-T 溶液で2回、PBS 溶液で1回、ELISA プレートを洗浄する。
- 7) もう一つの ELISA プレートに対しては5 (A) . 3 . 2 の設問(7)で考察した手順を実行する。その後、6)と同様な操作を行う。

(操作4:基質の酵素反応と定量操作)

- 8) 調製直後の基質溶液を 100  $\mu\text{L}$  ずつ ELISA プレートの全ての穴に連続分注ピペットで分注する。約 30 秒程度室温に放置し、着色が認められたら 2 M 硫酸 25  $\mu\text{L}$  ずつを全ての穴に連続分注ピペットを用いて加え、酵素反応を停止させる。
- 9) マイクロタイター (ELISA プレートと同様のもの) 用比色計を用い、波長 490 nm で各穴の吸光度を測定する。

5(A).3:結果のまとめと設問

5(A).3.1:結果のまとめ

(実験 A1) レポートには各々の ELISA プレートで得たヒト IgG に対する検量線を示し、各自の結果について考察せよ。

5(A).3.2:設問

- (1) EIA には様々な誤差要因が働く。再現性のよいデータを得るために特に注意すべき事項を、5(A).2.1(4)の操作番号をあげて列挙せよ。
- (2) 5(A).2.1の実験で、(操作2)と(操作3)はどのような目的の作業か。それぞれの操作の内容を説明せよ。
- (3) ホモジニアス法の利点と欠点をヘテロジニアス法との比較において考察せよ。
- (4) 免疫分析では検量線が直線となる領域はきわめて狭く、通常広い濃度領域の抗原を定量することとも相まって、検量線はシグモイド曲線となる。この理由について考察せよ。
- (5) High-dose hook effect が起こると、分析値は誤って過小評価につながる。特に臨床診断などでは生命にも関わることになる。上述のサンドイッチ法において B/F 分離のプロセスを工夫すれば、少なくとも過小評価に結びつく結果にはならないようにすることもできる。サンドイッチ法について、通常の化学分析法と同じように抗原過剰域では分析値が飽和するようにプロセスを立案せよ。(注:立案した方法は各自実験で確かめることになるので、予めこの設問に答えておくこと。)

(参考書)

- 1) 西岡久喜弥ほか、「役にたつ免疫実験法」、講談社サンエンティフィック。
- 2) 河西信彦ほか編著、「入門免疫学」、講談社サンエンティフィック。
- 3) 吉野二男ほか編著、「臨床生化学検査における分光測定法」、学会出版センター。
- 4) ストライヤー、「生化学(上、下)」、東京化学同人。

## 【実験 5(B)] バイオセンサー

### 5(B).1: 解説

#### 5(B).1.1: バイオセンサーの概要

生体中では少数の分子がきわめて高い選択性のもとに化学反応を進行させている。この優れた反応機構を利用したり、これに学び模倣しようと様々な研究が進められている。優れた選択性は、一般に生体膜や組織、あるいは生体分子などの分子認識機能に基づくものである。一方、分析化学において重要な2要素として、感度と選択性があげられる。高感度であっても選択性に劣れば、実試料において大量の夾雑物から目的の微量成分を検出することはできない。そこで、高感度検出機構に電極や光検出器を用い、生体物質に選択性を求め感度と選択性を両立させたセンサーが開発されている。センサーの成立ちから、これらはバイオセンサーと呼ばれることがある。

この実験5Bではバイオセンサーの一つとして尿素センサーを試作し、実際に微量尿素の定量を実習する。このセンサーは酵素膜とイオン電極の組合せによる酵素電極と呼ばれる選択性電極である。尿素はタンパク質代謝の最終産物であり、その測定は腎疾患、尿毒症、肝実質障害等の有用な診断の指標となっている。尿素はウレアーゼ酵素の作用により、アンモニアと二酸化炭素に分解される。生じたアンモニアは pH に応じて、アンモニウムイオンと平衡にある。従ってアンモニア、アンモニウムイオンあるいは二酸化炭素のいずれかに応答する電極にウレアーゼ固定化膜を組み合わせた酵素電極を作れば尿素の測定ができる。ここではアンモニウムイオンに感応するセンサーを作って利用する。

5(B).1.2: バイオセンサーの原理と基礎

(1) バイオセンサーの原理: バイオセンサーの基本構成を図10に示す。一般に化学物質を検出対象とするセンサーは化学センサーと呼ばれる。これらの化学センサーは、検出対象とする化学物質を認識する部位と、ここに発生する何らかの変化を電気信号に変換する部位を併せ持っている。2つの機能部位が分離されず、統合化されているものも多い。化学センサーの選択性は、認識機能部位の優劣にかかっている。この認識部位に生体物質の機能を用いたものをバイオセンサーと呼ぶ。バイオセンサーは、生体物質を利用した計測デバイス、生体系をモデルとした計測デバイス、生体系を対象とした計測デバイスに大別されよう。ここで実習するのは、酵素を用いた に分類されるバイオセンサーである。

まず、生体物質を利用したバイオセンサーの原理について説明しよう。生体内には多種多様な分子があり、単独であるいは集合体を形成した状態で、それぞれ固有の機能を発現している。近年分子認識の研究が盛んに進められているが、現在の段階では生体分子の分子認識機能は合成分子をはるかにしのいでいる。化学センサーの認識機能部位に生体物質の優れた分子認識機能を利用しようとする発想が、狭義のバイオセンサーの基本である。分子認識機能をもつ主な生体物質を表3に示す。これら生体物質の多くは単独で分子認識機能を発現する。しかし生体内では、分子認識が種々の制御系に連鎖している場合が多い。したがって、分子単独のみならず、分子集合体あるいは細胞や膜などの生体組織そのものをセンサー材料に利用することもある。

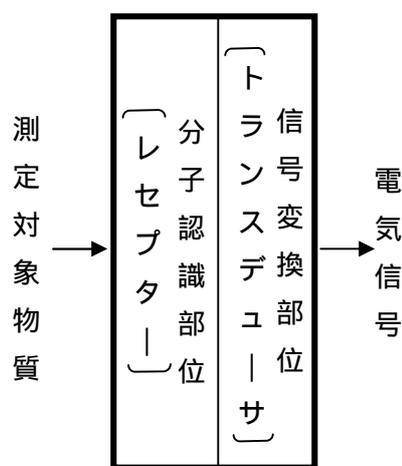


図10 生体物質を利用したバイオセンサーの基本構成

生体物質をセンサー材料として利用し得るようになった最大の要因は、生体物質を固体担体に固定化する技術が確立されたところにある。酵素をはじめ、抗体、結合タンパク質などの生体分子だけではなく、細胞内オルガネラ(小器官)の分子集合体や細胞に至るまで、本来の機能を損なわずに、溶存状態のものを固定化できたことは画期的である。また、生体膜の機能を損なわず

表3 分子認識機能をもつ生体物質

生体物質	認識される分子
酵素	基質、基質アナログ インヒビター 補酵素
抗体	抗原、抗原アナログ
結合タンパク質	ビオチン、レチナルなど
レクチン	糖鎖、糖鎖を持つ分子や細胞
ホルモンレセプター	ホルモン

に取り出してセンサーに適する形で固定化する技術も開発されている。つまり、これらの技術を総合すると、生体物質を膜、粒子、繊維などセンサーとして使いやすい形状にできるようになったことになる。生体物質の固定化技術については優れた成書や総説も多いので参考にすること。

さて、固定化生体物質を分子認識部位に用いることにより、いろいろな目的分析物質に対するバイオセンサーを構成することができる。分子認識部位で生じる変化は信号変換部位で電気信号に変換するが、まず分子認識部位で生じる変化に着目すると、化学変化、熱変化、光変化などがあげられる。ここで実習するのは、分子認識機構として酵素膜により化学変化を生じさせ、さらにその化学変化を感応膜で電気信号に変換する方式である。

酵素は特定の分子(基質)を認識し、その分子に特異的な反応を触媒する。つまり酵素が分子認識することに伴い、特定の物質が増減する。したがって、この物質の増減を電気信号に変換できるデバイスがあれば、バイオセンサーが成立する。この役割を果たしてくれるデバイスは、クラーク型酸素電極、過酸化水素電極、水素電極、水素イオン電極、イオン選択性電極、アンモニア電極、二酸化炭素電極、イオン感応性電界効果トランジスタ(ISFET)などである。

これらの基本構造を図11~13に示す。酵素電極、酵素センサーについては次の章で詳述する。

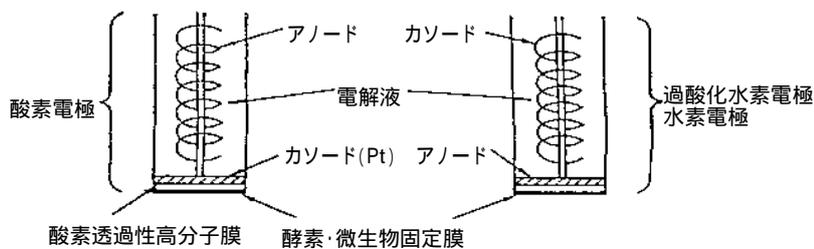


図11 化学変化を電気信号に変換する方式のバイオセンサー

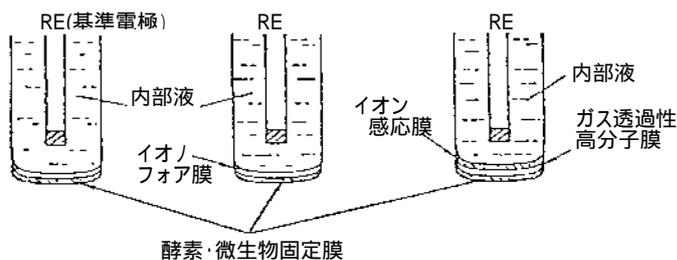


図12 化学変化を電気信号に変換する方式の

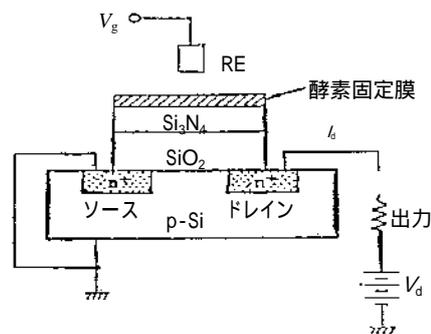


図13 化学変化を電気信号に変換する方式のバイオセンサー(3)

この他の信号変換部位の方式として注目されるのは、光変化を電気信号に変換する方式である。最近数多く見いだされている化学発光を触媒する酵素を利用すれば、発光量を電気信号強度に変換するデバイスを組み合わせることによりバイオセンサーを構成できる。分子認識部位を光ファイバーの先端に固定し、光をファイバー内に誘導して、フォトンカウンターやフォトダイオードなどで電気信号に変換する。あるいは光ファイバーを介さず、分子認識部位をフォトダイオードに直結

して信号変換する。適切な条件下では数光子、場合によっては単一光子でも検出することが可能であるので、光に変換する方式はきわめて感度の高い方式となることが期待されている。

分子認識における変化が電氣的なものであれば、信号変換デバイスは必要ない。しかし信号導出用の電極は必要である。抗体、結合タンパク質、あるいはレクチンなどの生体物質は、それぞれ対応する特定物質を認識し、安定な複合体を形成する。この複合体形成を固体表面で行うと、固体表面のポテンシャル構造が変化する。例えば、金属や半導体の表面に抗体分子を固定化するとしよう。この固定化抗体を溶液中の抗原と反応させれば、抗原抗体複合体を形成する。適当な基準電極とこれら金属または半導体との間の電位差を測定すれば、この反応前後において電位差の変動が認められる。これは金属や半導体の表面電位が変動することに起因すると考えられている。抗体を膜に固定化すれば、抗原抗体複合体の形成を膜電位の変化で知ることができる。以上のような構想でつくられたのが免疫センサーである。固体表面における表面電位変化を高感度に導出するために、FET(電界効果型トランジスター)のゲート表面を利用することも試みられている。

(2) 酵素センサー: 最初のバイオセンサーとして登場したのは、酵素センサーである。その原理は、1962年に Clark らによって提案され、1967年に Updike らによって発展させられた酵素電極にその源流を求めることができる。酵素センサーは固定化酵素(多くの場合膜状)を信号変換部位のデバイスに組み合わせ、酵素の基質分子を検出する目的で構成されたバイオセンサーである。酵素センサーの構成と原理を図14に示す。また、細胞内オルガネラや細胞には、複合酵素系が含まれている。複合酵素系では多数の酵素が系統的に配列し、特定の反応を触媒する。当然のことながら、複合酵素系は単独酵素よりも複雑・高度な反応を進めることができる。固定化オルガネラ、固定化細胞(特に微生物細胞)などを用いたバイオセンサーも可能である。それぞれ、オルガネラセンサー、微生物センサーと呼ばれている。これらのセンサーの原理は、基本的には酵素センサーに似ている。これらをまとめて図15に示す。

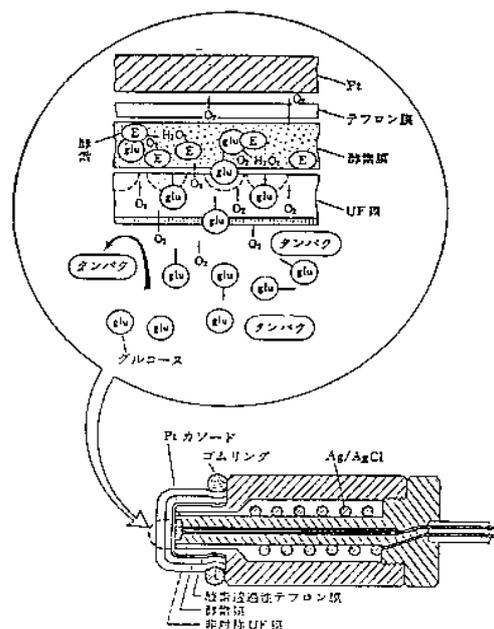


図14 酵素センサーの一例  
(グルコースセンサー)

さて、つぎに酵素センサーについてもう少し詳しく述べよう。酵素センサーは、図16に模式的に示すように、電極の感応面に固定化酵素膜を装着した構造をもち、酵素膜中で起こる酵素反応の際の電極活物質に下地の電極が応答することを基本原理としている。酵素反応には、酸素が消費されたり、過酸化水素、アンモニアまたはアンモニウムイオン、二酸化炭素、水素イオン、シ

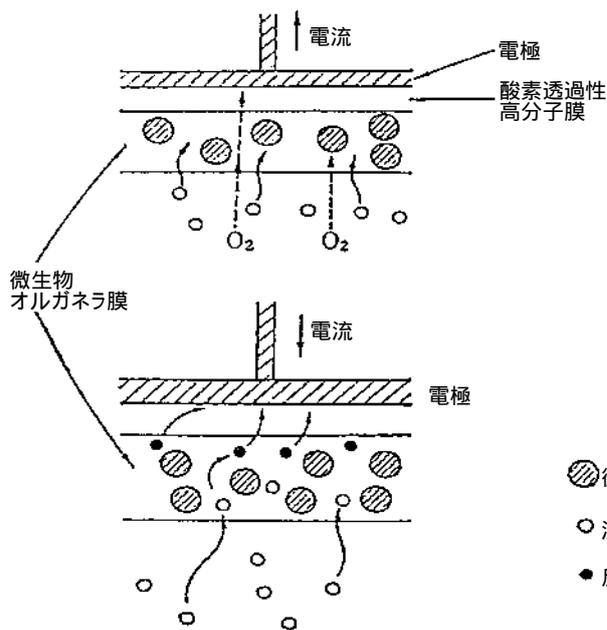


図15 微生物センサー、オルガネラセンサーの原理

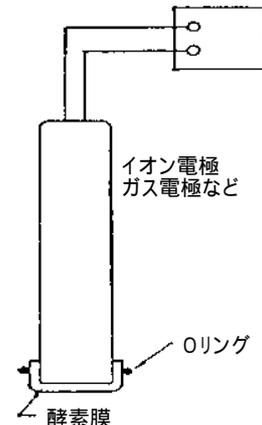


図16 酵素センサーの形態

アン化物イオンなどが生成するものも多く見られる。したがって、酵素センサーの下地電極として、これらのイオンやガスに応答する電極が選ばれる。電極は測定方式によって、ポテンシオメリー型(電位法)とアンペロメリー型(電流法)、pH電極、シアン化物イオン電極、ヨウ化物イオン電極などの電極があり、さらにアンペロメリー型には、酸素検出方式と過酸化水素検出方式の電極がある。また、1つの酵素反応だけでは電極不活性化の場合でも、別の反応を組み込ませることにより電極活性にすることができる。これまでに、様々な酵素反応がバイオセンサーに応用されている。詳細については参考書を参照のこと。

電極の感応面に装着される酵素膜は、酵素の懸濁液をそのまま透析膜で覆い固定することもあるが、多くの場合、水不溶性の高分子担体に結合させた固定化酵素が用いられる。これは酵素が溶液状態では比較的不安定なのに比べ、適当な高分子担体に固定化することにより安定化することができるからである。このため固定化酵素を組み合わせた酵素センサーは、繰り返し基質の測定ができるという特長を持っている。

図17に酵素センサーの例を示す。図中Aは酵素電極に酵素・ポリアクリルアミドゲル膜を装着し

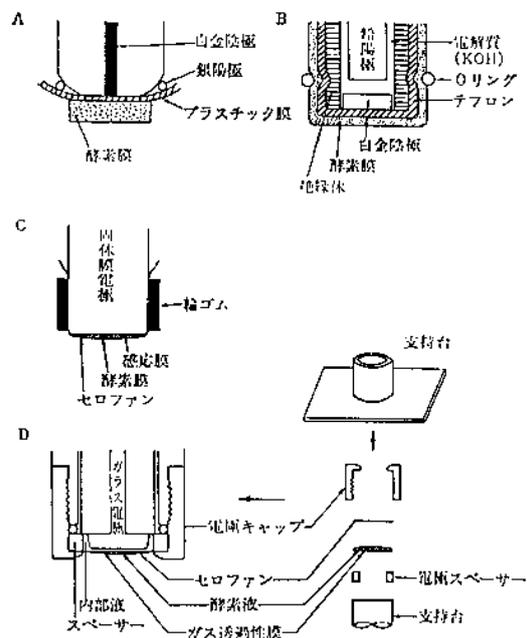


図17 酵素膜を各種電極に被覆した酵素センサー 下地電極A、B:白金電極; C:固体膜電極; D:アンモニア電極あるいは二酸化炭素電極

たものであり、Bは酵素・コラーゲン膜を酵素電極のテフロン膜に装着したものである。Cは固体膜電極の感應面に酵素溶液を塗り、透析膜で覆い、幅のある輪ゴムで固定しただけの簡単なものである。Dはアンモニア電極のガス透析性膜に酵素溶液を透析膜で覆ったものであるが、固定化酵素でも同様である。

(3) 酵素反応とセンサーの応答: 図17に示した酵素センサーを測定しようとする基質を含んだ液体に浸すと、基質が酵素膜内に拡散していき膜内で酵素反応が進行する。その結果、電極活性な消費物や生成物の濃度変化に対して下地電極が応答し、目的とする基質の濃度に応じた電流あるいは電位変化が得られ、これらの値から基質の定量が可能となる。例えば、グルコースや尿酸の酸化反応において、減少する酸素量を酸素検出用白金電極からなるセンサーで測定する場合、酵素膜中で酸素は消費され、酸素分圧は減少する。すなわち白金陰極における酸素還元電流は減少し、電流の変化量は基質濃度に比例する。また、アンモニアガス電極からなる酵素センサーで尿素を定量する場合は、膜内で生成したアンモニアが電極のガス透過性膜を通過し、アンモニア電極の内部液(塩化アンモニウム溶液)のpHを変化させ、そのpH変化に内部のガラスpH電極が応答するものである(本実験で行う尿素センサーはアンモニウムイオン電極を下地電極とするため、このセンサーとは応答メカニズムが異なるので注意すること)。この場合に得られる電位変化量は、基質濃度の対数値に比例する。これらの過程を模式的に図18に示す。

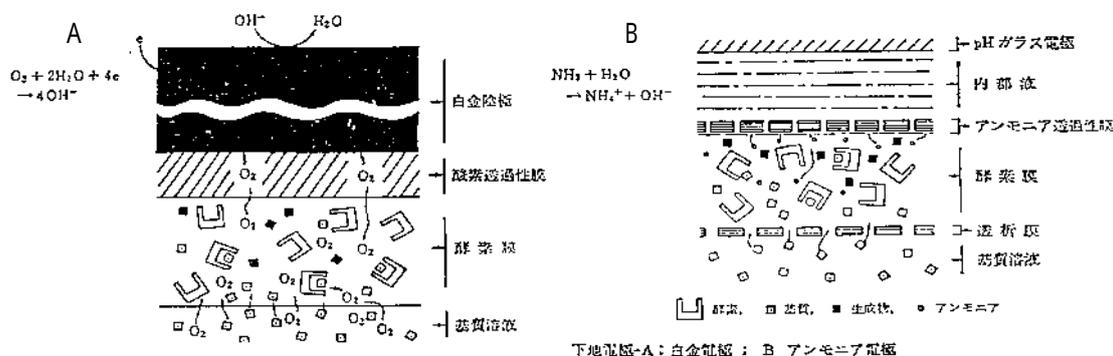
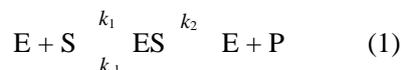


図18 酵素センサーの測定原理模式図

A: 下地電極が白金電極、B: 下地電極がアンモニア電極

基質溶液を加えてから電気信号として測定値が得られるまでの時間を応答時間といい、実際の測定にあたっては応答時間は短いほどよい。応答特性は、下地電極の特性に加えて酵素反応の特性にも依存し、酵素の活性量、基質濃度、酵素膜の厚さ、pH、温度、イオン強度、液のかき混ぜ状態によって左右される。普通、酵素センサーの酵素膜は酵素の活性を高くし、しかもできるだけ薄いものを用いる。また、測定中は溶液を攪拌子でかき混ぜると基質の酵素膜への拡散速度が大きくなり、酵素膜内での反応がすみやかに進行し、応答時間が短くなる。

酵素反応はその初期において、一般に次の Michaelis-Menten 型の反応に従うことが知られている。



ここで、E、S、ES および P はそれぞれ遊離の酵素(濃度[E])、基質(濃度[S])、酵素・基質複合体(濃度[ES])および生成物(濃度[P])である。 $k_1$ 、 $k_{-1}$ および $k_2$ は、それぞれES複合体の生成反応と解離反応、およびESから生成物に解離していく反応の速度定数を表す。一連の反応後の遊離酵素 E は再び反応を促進する。

基質濃度が酵素量に比べ十分多い場合には、定常状態法( $d[ES]/dt=0$ )により酵素反応の初速度  $v$  についての式を導くと(2)式が得られる。

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

ここで、 $V_{\max}$  は最大初速度と呼ばれ、 $K_m$  は Michaelis 定数で初速度  $v$  が  $V_{\max}$  の 1/2 になる基質濃度と定義される。酵素センサーの酵素膜内で酵素反応が起こるときは、基質の膜拡散をも考慮しなければならなくなり、厳密な取り扱いはもっと複雑になる。

### 5(B).1.3: 尿素センサー

この章では本実験で実習する尿素センサーについて説明する。

今回作製する尿素センサーの測定原理を図19に模式的に示す。この尿素センサーはアンモニウムイオン電極を下地電極とし、この感応膜の上をウレアーゼ固定化膜が被覆している。尿素はウレアーゼの作用により、次のようにアンモニアと二酸化炭素に分解される。



生じたアンモニアは pH に応じて、アンモニウムイオンと平衡にある。したがって、ここではアンモニウムイオンに応答する電極を検出部位に用いる。

下地電極のアンモニウムイオン電極の電位は(4)式の Nernst 式に従う。

$$E = E_0 + \frac{2.303RT}{nF} \log a_i \quad (4)$$

ここで  $E_0$  は電気化学セル構成によって決まる基準電位、 $R$  は気体定数、 $T$  は温度(K)、 $n$  は目的イオンの電荷数、 $F$  はファラデー定数、 $a_i$  は溶液中での目的イオン  $i$  のイオン活量である。ここで、目的イオンは 1 価のアンモニウムイオンであり、便宜上活量を濃度で置き換えて取り扱えば、(4)式は以下のようなになる。

$$E = E_0 + \frac{2.303RT}{F} \log[NH_4^+] \quad (5)$$

(5)式から、測定によって得られる電位  $E$  はアンモニウムイオン濃度の対数に対して  $2.303RT/F$  の傾きを持った直線となることがわかる。

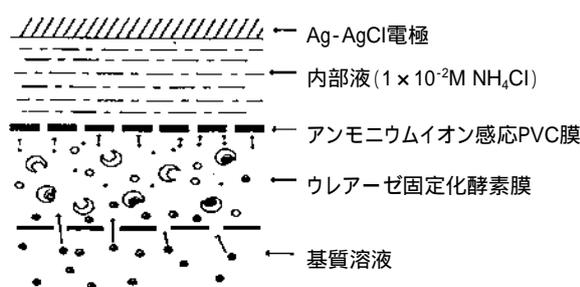


図19 尿素電極の測定原理模式図

尿素センサーを尿素溶液中に浸すと、まず基質である尿素が酵素膜内に拡散していき、酵素と接触する。そこで、(3)式の酵素反応が進行する。その結果、電極活性な生成物( $\text{NH}_4^+$ )の濃度が増大する。生成したアンモニウムイオンに対し、アンモニウムイオン電極が応答する。定常状態においてはアンモニウムイオン濃度は試料の尿素濃度に比例するので、(5)式は(6)式に書き直せる。

$$E = E_0 + \frac{2.303RT}{F} \log[\text{CO}(\text{NH}_2)_2] \quad (6)$$

る。

本実験では、液膜型アンモニウムイオン応答電極の感応膜表面にウレアーゼをポリアクリルアミドゲルで包絡した膜を取り付けた尿素センサー(図20に示す)を試作し、それにより尿素を定量する。

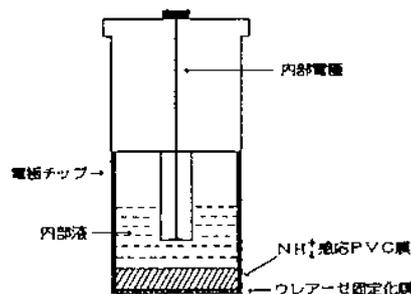


図20 尿素電極の構造

## 5(B).2:実験 尿素センサーの作製と尿素の定量

### 実験の目的

本実験では、天然物イオノフォアであるノナクチンをアンモニウムイオン認識分子として用いる液膜型アンモニウムイオン選択性電極と、ウレアーゼ固定化酵素膜を組み合わせたバイオセンサー(尿素センサー)を実際に作製し、その構造と作動原理を理解する。また、電気化学分析の初歩についても学習する。

### 5(B).2.1:実験B1.アンモニウムイオン感応膜の作製

#### (1)器具

ブランクチップ(液膜イオン電極キット)、テフロンフィルター、スターラー

#### (2)試薬

- 1) ノナクチン溶液: ノナクチン 20 mg をテトラヒドロフラン(THF) 3 mL に溶解する。
- 2) テトラキス-4-クロロフェニルホウ酸カリウム(K-TCPB)溶液: K-TCPB を 10 mg はかりとって THF 6 mL に溶解する。
- 3) *o*-ニトロフェニルオクチルエーテル(*o*-NPOE)溶液: *o*-NPOE 2 g に THF 3 mL を加えて溶解する。
- 4) ポリ塩化ビニル(PVC)
- 5) テトラヒドロフラン(THF)

#### (3)実験操作

- 1) 試料びんに PVC 6 mg をはかりとり、これにノナクチン溶液を 200  $\mu\text{L}$ 、K-TCPB 溶液、*o*-NPOE 溶液をマイクロピペットでそれぞれ 20  $\mu\text{L}$  加える。乾燥したミニ回転子を用い、スターラーで約

30分攪伴して、試料ビン中の THF 溶液が約 50  $\mu$ L になるまで THF を徐々に揮発させる。

- 2) 得られた粘性が高い PVC 溶液を、パストゥールピペットを用いてブランケット上のテフロンフィルターに移し入れ、THF を完全に揮発させるために 37 °C の恒温層に 1 時間入れる。

## 5(B). 2. 2: アンモニウムイオン電極の作製と測定

### (1) 器具

電位差計 (pH メーター)、スターラー

### (2) 試薬

- 1) トリス緩衝液 (0.1 M): 12.4 g のトリスヒドロキシメチルアミノメタン (TRIS) をはかりとって 1 L ビーカーに入れ、約 800 mL のイオン交換水で溶かし、これにガラス pH 電極を挿入する。pH メーターをみながら pH が 7 になるまで駒込ピペットで 1.0 M 塩酸を少しずつ加える。これを 1 L メスフラスコに移し、標線までイオン交換水を加えてふりまぜる。
- 2)  $2 \times 10^{-1}$  M 塩化アンモニウム溶液: 塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) 1.0698 g を 100 mL ビーカーにはかりとり、イオン交換水で溶かし、100 mL メスフラスコに移し、標線までイオン交換水を加えてふりまぜる。
- 3)  $1 \times 10^{-2}$  M 塩化アンモニウム溶液: 上記の  $2 \times 10^{-1}$  M 塩化アンモニウム溶液を正確に 5 mL 採取して 100 mL メスフラスコに入れ、標線までイオン交換水を加えてふりまぜる。
- 4) トリス緩衝液を添加した 0.1 M 塩化アンモニウム溶液: トリス緩衝液を正確に 10 mL 及び  $2 \times 10^{-1}$  M 塩化アンモニウム溶液を正確に 10 mL とって 50 mL ビーカーに入れる。
- 5) 検量線用アンモニウム溶液の調製:  $2 \times 10^{-1}$  M 塩化アンモニウム溶液 10 mL をホールピペットで 100 mL メスフラスコにとり、イオン交換水を標線まで加える。同様の操作を繰り返し、10 倍希釈してさらに  $2 \times 10^{-3}$  M、 $2 \times 10^{-4}$  M、 $2 \times 10^{-5}$  M 塩化アンモニウム溶液をそれぞれ 100 mL ずつ調製する。

### (3) 実験操作

(操作 1. アンモニウムイオン電極の組立)

- 1) 作製した電極チップに  $1 \times 10^{-2}$  M 塩化アンモニウム溶液を内部液として加え、アンモニウムイオン 感応膜の内側に気泡が認められた場合は除去する。さらに内部参照電極 ( $\text{Ag-AgCl}$ ) をゆっくりまわしながら装着する。
- 2) この電極をトリス緩衝液を添加した 0.1 M 塩化アンモニウム溶液に約 30 分間浸す。

(操作 2. アンモニウムイオンの測定)

- 3) アンモニウムイオン電極及び比較電極をイオン交換水でよく洗う。
- 4) 30 mL ビーカーにトリス緩衝液を 10 mL と  $2 \times 10^{-5}$  M 塩化アンモニウム溶液を 10 mL とり、回転子を入れ、さらに、アンモニウムイオン電極と参照電極を浸し、攪伴しながら電位を 30 秒毎

に 3 分間記録する。

- 5) 同様に、 $2 \times 10^{-4}$  M、 $2 \times 10^{-3}$  M、 $2 \times 10^{-2}$  M、 $2 \times 10^{-1}$  M 塩化アンモニウム溶液もトリス緩衝液で 2 倍希釈し、電位を測定する。

### 5(B). 2. 3: 尿素センサーの作製と尿素の測定

#### (1) 器具

遠心分離器、水銀ランプ、冷蔵庫、電位差計 (pH メーター)、スターラー

#### (2) 試薬

- 1) 尿素溶液 ( $6 \times 10^{-2}$  M): 尿素を 100 mL ビーカーに 0.360 g はかりとり、水に溶解した後 100 mL メスフラスコに移し、標線まで水を加えてよくふりまぜる。
- 2) トリス緩衝液
- 3) ウレアーゼ、アクリルアミド、N,N-メチレンビスアクリルアミド、リボフラビン、ペルオキシ二硫酸アンモニウム

#### (3) 実験操作

##### (操作 1、尿素電極の作製)

- 1) 50 mL ビーカーにトリス緩衝液 10 mL をとり、これにアクリルアミド 1.2 g、N,N-メチレンビスアクリルアミド 0.23 g、リボフラビン 1.1 mg、ペルオキシ二硫酸アンモニウム 1.1 mg をはかりとり、攪拌子 2 個を投入しスターラーにて攪伴溶解する。この溶液 100  $\mu$ L を 1.5 mL マイクロチューブにとり、ウレアーゼ 35 mg を加える。これを攪拌器にて 3 分間攪伴した後、約 6000 回転にて 2~3 分間遠心分離器を行う。
- 2) 直ちに、100  $\mu$ L マイクロピペッターチップの先端 5~8 mm をカッターにて切り落としたチップを用いて、マイクロチューブ中の上澄みを吸い取り、専用廃液だめに捨てる。下層の泥濁部分(酵素ゲル液)を、作製したアンモニウム電極チップの感応膜面(濡れている場合はキムワイプで拭き取る)に、上記のマイクロピペッターチップを用いて約 10  $\mu$ L を取り、専用のヘラにてまんべんなく塗布し、直ちに(3)以下の操作に移る。
- 3) チップの酵素ゲルに紫外光を 1 時間 30 分から 2 時間あて、酵素の固定をする。
- 4) チップをアンモニウムイオン電極の組立と同様の操作で組立て、イオン交換水で 2 倍に希釈したトリス緩衝液に浸し、約 30 分間放置する。

##### (操作 2、尿素の測定)

- 5) 酵素電極及び比較電極をイオン交換水でよく洗う。30 mL ビーカーに 10 mL のホールピペットでトリス緩衝液を 10 mL および  $2 \times 10^{-4}$  M 尿素溶液を 10 mL とり、攪はん子を入れる。酵素電極と参照電極を浸し、攪伴しながら 30 秒毎に 5 分間電位を記録する。同様に、 $6 \times 10^{-4}$  M、 $2 \times 10^{-3}$  M、 $6 \times 10^{-3}$  M、 $2 \times 10^{-2}$  M、 $6 \times 10^{-2}$  M 尿素溶液もトリス緩衝液で 2 倍希釈して測

定する。

5(B).3:結果のまとめと設問

5(B).3.1:結果のまとめ

センサーの応答特性や検量線などをきれなくレポートに記載し、各自の結果について考察せよ。

5(A).3.2:設問

- (1)この実験で作製したセンサーに関して、アンモニウムイオンを感応する原理を述べよ。
- (2)電極の応答速度はアンモニアと尿素で異なる。いかなる理由によるか。
- (3)以上の説明のように、酵素センサーでは分析対象(analyte)は基質 S であり、信号変換部位で検出されるのは酵素反応性生物 P である。信号強度は [P] に比例するものとし、検量線の振舞いを図示し、(2)式に基づいて説明せよ。(ヒント:基質濃度を [S] ( $K_m$  と [S])  $K_m$  の領域に分けて考察せよ。)

(参考書)

- 1) 鈴木周一編、「バイオセンサー」、講談社。
- 2) 鈴木周一編、「イオン電極と酵素電極」 講談社。

【実験 5(C)]タンパク質のイオン交換分離とゲル電気泳動による確認

5(C).1:解説

5(C).1.1: タンパク質分離の概要

生命現象の主役はタンパク質であると言ってもけっして言い過ぎにはならない。タンパク質は代謝、情報の伝達、免疫などすべての生命活動を分子のレベルで遂行する機能素子である。免疫分析やバイオセンサーなどは、タンパク質が分子を識別する高い能力を利用したものである。タンパク質を利用した分析法を組み立てる際には、タンパク質を必要な程度に精製することによって、不必要なもの、あるいは妨害する物質を除く必要がある。

タンパク質は アミノ酸の重合体であるポリペプチド鎖を主成分とするが、その特殊な折りたたみ構造が活性発現には必須である。この折りたたみ構造は高温、極端に低いあるいは高いpH、非極性溶媒との接触などによって破壊され、タンパク質は変性する。そこで、活性を保った状態でタンパク質を分離精製するには、変性が起こらない条件を選んで行う必要がある。また、細菌などの微生物に由来するタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)はポリペプチド鎖の分解によってタンパク質の活性を失わせるので、容器や器具を清浄に保つことも重要である。

タンパク質の分離には、低温下にアルコールやアセトンを加えることによる沈殿法、高濃度の硫酸アンモニウムによる沈殿法、タンパク質をサイズによって分離する限外濾過膜法、各種クロマトグラフィー法、電気泳動法などが利用できる。本実習では、イオン交換クロマトグラフィー法を用いてタンパク質を分離し、精製の度合いをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって確認する。

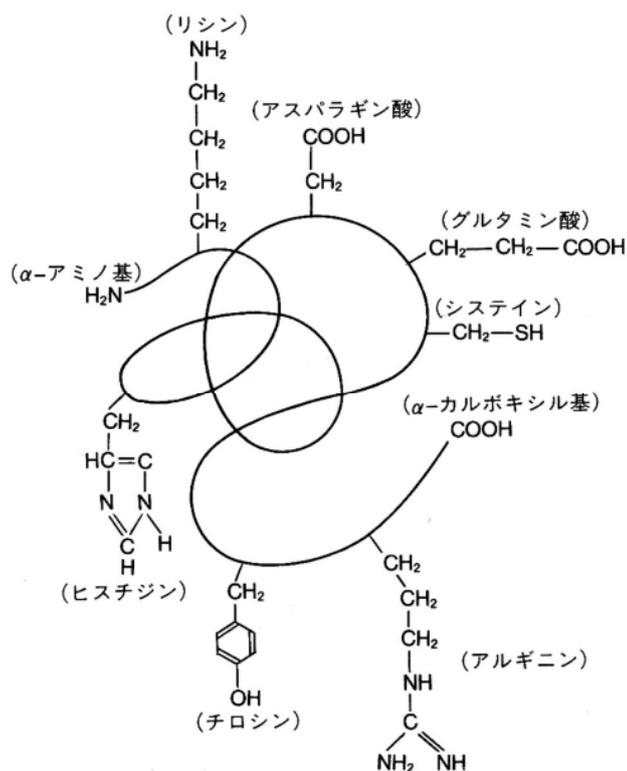


図21 タンパク質の解離基

すべての解離基は非解離型で描かれている。実際の解離状態はpHによって変化する。(原図 真鍋 敬)

5(C).1.2: イオン交換クロマトグラフィー

ポリペプチド鎖の両末端はアミノ末端とカルボキシル末端とよばれ、遊離のアミノ基とカルボキシル基が存在する。その他にアミノ酸の側鎖にも様々な解離基が存在する(図21および表4)。これらの中で、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基などの酸性の解離基はpKaに対して高いpHにおいて、負の電荷をもつものに対し、イミダゾール基、アミノ基、グアニジノ基などの塩基性の解離基はそれらの pKa に対して低いpHにおいて正の電荷を帯びる。このため、タンパク質分子全体としては、あるpHにおいて電荷の総和がゼロになる。このpHを等電点という。等電点より高いpHでは電荷の総和は負となり、低いpHでは正となる(図22)。

総電荷が負のタンパク質は陰イオン交換体、総電荷が正のタンパク質は陽イオン交換体を使って分離をおこなう(表5)。タンパク質の電荷はpHによって変わるので、緩衝液によってpHを制御する。通常10-20 mM程度の低濃度の緩衝液でイオン交換カラムを平衡化し、同じ緩衝液に溶解したタンパク質を添加する。吸着したタンパク質はカラムに流入させる緩衝液にNaClなどの中性の塩を添加することによって溶離する。中性の塩はイオン交換基の対イオンとしてタンパク質に置き換わることによってタンパク質の溶離させる。塩の濃度をしだいに高めることによって、吸着したものの同士を分離することも可能である。

本実習では、4種のタンパク質の混合物を試料として、陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離を行う(表6)。

表4 タンパク質の解離基

解離基	pKa
カルボキシル基 (カルボキシル末端)	3.6
カルボキシル基 (アスパラギン酸)	3.95
カルボキシル基 (グルタミン酸)	4.45
イミダゾール基 (ヒスチジン)	6.45
アミノ基 (アミノ末端)	7.6
スルフヒドリル基 (システイン)	8.5
フェノール性ヒドロキシル基 (チロシン)	9.8
アミノ基 (リシン)	10.2
グアニジノ基 (アルギニン)	12.5

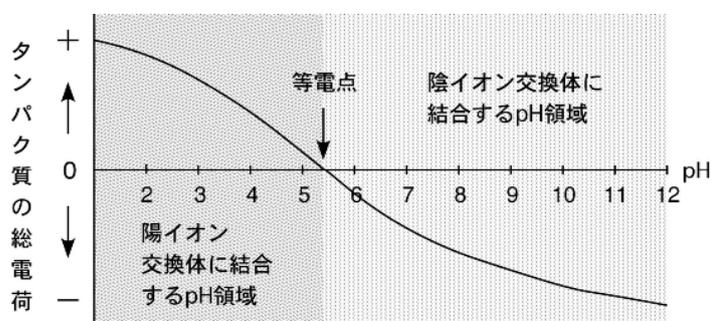


図22 タンパク質の電荷とpH

表5 イオン交換体の種類と交換基

イオン交換体	主な交換基
強酸性イオン交換体	スルホプロピル基
弱酸性イオン交換体	カルボキシメチル基
弱塩基性イオン交換体	ジエチルアミノエチル基
強塩基性イオン交換体	第4級アンモニウム基

表6 実験で用いるタンパク質

タンパク質	起源	等電点(pI)	分子量 (Da*)
ミオグロビン	ウマ	6.9	17,000
コナルブミン	小麦	4.9	77,000
オバルブミン	ニワトリ卵白	4.6	45,000
トリプシン・インヒビター	ダイズ	4.5	17,500

\* : Da (ドルトンまたはダルトン) はタンパク質の分子量を表す際に使われる単位

### 5(C).1.3: SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

クロマトグラフィーによる分離が成功したか否かを確認するにはSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動が最適である。この方法は分離能が高いだけでなく、含まれるポリペプチド鎖の分子量に関する情報も得ることができる。また、必要な試料量も1 $\mu$ g程度と、感度が高い。以下に本法の原理を述べる。

#### 【ゲルの分子ふるい効果】

身近なゲルの例としては、寒天、ゼリー、こんにゃく、シリカゲルなどがある。これらのものは、その構成成分が三次元の網状構造をとっていて、その網の内部に液体や気体が入り込めるようになっている。これがゲルの特性である。ゲルの網目が分子の大きさに匹敵する程小さくなってくると、網目の大きさに比べて小さな分子は比較的自由にゲル中を移動するのにたいして、大きな分子は移動しにくくなる。このような現象を示す物質を「分子ふるい(molecular sieve)」と呼ぶ。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法の分子量による分離は、この分子ふるいの効果に基づいている。

#### 【ポリアクリルアミドゲル】

アクリルアミドとビスアクリルアミドの共重合によってつくられるポリアクリルアミドゲルはタンパク質の大きさ(分子量1~100万)の範囲にちょうど適した分子ふるい効果を生み出せるゲルである(図23)。重合する際のアクリルアミドの濃度と架橋剤であるN,N'-メチレンビスアクリルアミドの濃度を変えることによってゲルの網目の大きさを調節することができる。

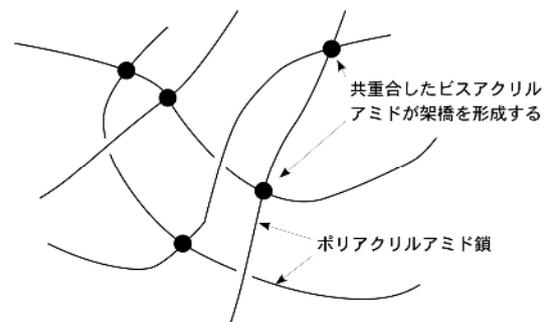


図23 アクリルアミドとビスアクリルアミドの共重合によって形成されるポリアクリルアミドゲルの概念図

#### 【SDS-タンパク質複合体の電気泳動】

すでに述べたように、タンパク質を構成するアミノ酸の側鎖には、pKaの異なる解離基が存在するので、タンパク質の電荷はpHによって変化する。溶液状態のタンパク質に直流の電場をかけると、全体として正の電荷を帯びたタンパク質は陰極方向に、負の電荷を帯びたタンパク質は陽極方向に電気泳動する。この際の泳動速度はタンパク質の大きさ、形、溶液の粘性などで変化するが、タンパク質の電荷に最も影響を受ける。

一方、SDS (sodium dodecylsulfate) とタンパク質の複合体の場合には、タンパク質の種類にかかわらず、陽極方向へ一定の速度で泳動することが知られている。これは、ポリペプチド鎖に多数のSDSが結合することによって、その硫酸基の電荷がタンパク質の電荷の違いを覆い隠してしまい、どのタンパク質についても単位分子量あたりの負電荷がほぼ等しくなることによると考えられる。

#### 【SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法】

自由溶液中ではSDSとタンパク質の複合体がタンパク質の種類に係わりなく、ほぼ一定の速度で電気泳動されるが、これをポリアクリルアミドゲル中で行ったらどうであろうか。複合体は同じ速度で移動しようとするが、ポリアクリルアミドゲルの分子ふるい効果によって、大きな分子ほど動きにくくなる。この結果、ゲル中での泳動速度は分子の大きさだけの関数となり、電気泳動度と分子量の間に一対一の対応関係が生まれる。泳動度から分子量を求めるには、分子量がすでに分かっているタンパク質をいくつか泳動して、分子量と泳動度の関係を示す検量線を作製することによって求められる。

分子量測定の精度を上げるには、2-メルカプトエタノールなどの還元剤によって、システインの側鎖間につくられるジスルフィド結合を切断する必要がある。タンパク質はSDSと複合体をつくることによって変性し失活する。また、複数のポリペプチド鎖からなるタンパク質では、個々のポリペプチド鎖への解離が起こる。

本実習ではイオン交換クロマトグラフィーによる分離がどのように行われたかを、各分画のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって確認する。

## 5 (C). 2: 実験・タンパク質のイオン交換分離とゲル電気泳動による確認

### (1) 器具

電気泳動装置 (BIO-RAD)、水平回転振蕩器、イオン交換筒、バット

### (2) 試薬

- 1) 陰イオン交換樹脂 (BIO-RAD)
- 2) 緩衝液(Buffer)A液: 10 mM Tris/HCl pH 8.2
- 3) 緩衝液 B液: 10 mM Tris/HCl pH 8.2 containing 500 mM NaCl
- 4) サンプル Buffer : 試験管に 0.5 M Tris/HCl (pH 6.8) 1 mL、0.1% BPB 0.5 mL、10% SDS 1.6 mL、グリセリン 0.8 mL、2-メルカプトエタノール 0.4 mL と水 4 mL を加え混合する。

**(注)2-メルカプトエタノールは毒物である。取り扱いは液体を通さない手袋を着用し、局所排気装置の下で行う。身体に付着した場合には流水で洗浄する**

- 5) 泳動用緩衝液: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS 溶液とし HCl にて pH 8.3 に調整する。
- 6) 泳動用ゲル (READY GELS J、分離ゲル 12.5%T、BIO-RAD)

- 7) 分子量マーカー (250 ~ 10 kDa、BIO-RAD)
- 8) CBB 溶液 (タンパク質染色用色素 Coomassie Brilliant Blue)
- 9) 各種タンパク質 (以下のタンパク質の内、等電点が離れている 3 種を選択し、試料とする)

添加タンパク	等電点 (pI)	分子量 (Da)
ミオグロビン (ウマ)	6.9	17,000
カルボニックアンヒドラーゼ -ラクトグロブリン	5.85	30,000
コナルブミン	5.1	18,400
オバルブミン (ニワトリ)	4.9	77,000
トリプシンインヒビター (ダイズ)	4.6	45,000
	4.5	17,500

### (3) 実験準備

#### 1) 混合タンパク質溶液と 1/5 混合タンパク質溶液の調製

1 個の 5 mL プラカップに 3 種のタンパク質を各 2 ~ 3 mg 採取し、これに A 液 2 mL を加えスターラーにてゆっくり溶解し、混合タンパク質溶液とする。この 100  $\mu$ L と、A 液 400  $\mu$ L を 1.5 mL マイクロチューブに採取攪拌し、これを 1/5 混合タンパク質溶液として電気泳動の標準とする。

#### 2) イオン交換樹脂装填

イオン交換筒の目盛りでイオン交換樹脂 5 mL 加え、下部からの溶液の落下が無くなったら樹脂の界面まで押さえフィルターを押し込みすぎないようにテフロン棒で挿入する。(フィルターの押し込みすぎによる樹脂の圧縮、樹脂とフィルターとの間隔が開いても溶液の流出は遅くなる)これに A 液 を約 50 mL 流し洗浄し、上下のキャップを閉める。

#### 3) 各分取用溶液の調製

緩衝液 A 液( 10 mM Tris/HCl pH 8.2 )100 mL に食塩を加え B 液( 10 mM Tris/HCl pH 8.2 containing 500 mM NaCl ) にし、この B 液と A 液を以下の如く 10 mL 目盛付き試験管に加え混合し、各分取用溶液 5 mL を調製する。

A 液 : B 液 = 10:0、9:1、8:2、7:3、6:4、5:5、4:6

#### 4) SDS-PAGE ゲルの作製 (ビデオを参考にしてください)

- (1) スペーサー付ガラスプレートの上にショートガラスプレートを重ねる。
- (2) 重ねたガラスプレートをキャスティングフレームに上から挿入する。この際、2 枚のガラスプレートの下端面が揃うように注意する。
- (3) ガラスプレートがキャスティングフレームにしっかり固定されるようにカムを、ゆっくりと閉じ、ゲルカセットアセンブリをつくる。プレートの両方の下端の二枚のガラス板に段差がないことを手の爪でこすり確認する。少しでも段差がある

とゲル溶液を入れたとき、下から漏れる。このゲルカセットアセンブリに水を注入し、2~3分待ち液漏れをしないか確認し、水を充分除去する。

- (4) ガラスカセットアセンブリをキャストリングスタンドのガスケットの上に置く。スプリングレバーで押さえて、ガスケットに密着させる。ガラスサンドイッチにコームを差し込み、コームの下端より、約 1 cm のところにペンで印をつけ、分離ゲル溶液を注入する際の量の目安とする。
  - (5) 分離ゲルの作成を行う。(15%T アクリルアミド・ビス, スペーサー厚 0.75 mm) (分離ゲルに過硫酸アンモニウムを加えるとゲルの固化が数分で直ちに始まるので下記の操作は、滞りなく速やかに行う。このため、手元に道具、試薬を用意しておき一挙に行うようにする)
- (注)以下のアクリルアミドモノマーは神経毒なので取り扱いに充分注意すること。取り扱いは液体を通さない手袋を着用し、こぼした液体はよくふき取る。身体に付着した場合は流水で洗浄する。

#### 分離ゲル混合液 (調製済み)

水	2.4 mL
1.5M トリス-HCl バッファー (pH 8.8)	2.5 mL
30% アクリルアミド・ビス溶液	5.0 mL
10% SDS	100 $\mu$ L

#### 10% 過硫酸アンモニウム (APS) の調製

0.1 g の過硫酸アンモニウムをガラス試験管に取り、0.9 mL の水を加えボルテックスにて混合する。

操作： 分離ゲル混合液 5 mL を 15 mL プラスチック目盛り付き試験管に取り、10% 過硫酸アンモニウム 50 $\mu$ L を加え泡立てないように静かにかつ十分にボルテックスにて速やかに混合する。直ちに TEMED 5 $\mu$ L を泡立てないように静かにかつ十分にボルテックスにて速やかに混合する。

直ちに、この溶液約 3 mL をゲルサンドイッチの間に、1 mL マイクロピペッターを用いて速やかに注入し、直ちに以下の操作を行う。

- (6) イソプロパノール/水 (95/5) 混合液約 1 mL をゲルの上面を乱さないように静かに重層する。その後、30 分ほど室温に放置してゲルを固まらせる。  
\* 30 分後、試験管内の余ったゲルの固まり具合を確認する (確認後ただちに、ゲルは除去しづらくなるので、ニードルを用いて所定の場所に廃棄する)。
- (7) 分離ゲルが固まったら重層液を捨て、ゲルの上面を 3 回ほどイオン交換水ですすぐ。
- (8) 濃縮ゲルの作成を行う。(4% T)

(濃縮ゲルに過硫酸アンモニウムを加えるとゲルの固化が数分で直ちに始まるので下記の操作は、滞りなく速やかに行う。このため、手元に道具、試薬を用意しておき一挙に行うようにする)

濃縮ゲル混合液(調製済み) 2 mL  
0.25 M トリス-HCl (pH 6.8)  
0.1% SDS  
4% T アクリルアミド・ビス

操作：上記の濃縮ゲル混合液 2 mL に、10% 過硫酸アンモニウム 50  $\mu$ L 加え、泡立てないように静かにかつ十分、速やかにボルテックスにて混合し、ただちに電動ピペットにて TEMED 2  $\mu$ L を加え、泡立てないように静かにかつ十分、速やかにボルテックスにて混合したらゲルサンドイッチの間に、1 mL マイクロピペッターを用いて約 1.2 mL 注入し、直ちに以下の操作に移る。(注) ゲル作成時に泡立つと固まらない

- (9) サンプルウェルを作成するために、空気が入り込まないように斜めにコームを傾けて差しこむ、溶液が少なく、気泡を内包するようであれば、速やかにコームを抜き、濃縮ゲルをたしてコームを差し込む。その後、30 分ほど室温に放置してゲルを固まらせる。
- \* この場合も 30 分後に、試験管内の余ったゲルの固まり具合を確認する(確認後直ちに、ゲルは除去しづらくなるので、ニードルを用いて所定の場所に廃棄する)
  - \* 作製したゲルは、キャストフレームから外し、湿らしたペーパータオルに包み、ビニール袋に入れ保管する。

#### (4) 操作

##### 1) 各タンパク質の分取

1/5 混合タンパク質溶液採取後の混合タンパク質溶液全てをイオン交換筒に添加し、水滴の落下が無くなったら、各分取用溶液を食塩濃度の薄い順に 5 mL ずつ添加し同一試験管に採取する。(終了後、初めに B 液 50 mL 次に A 液 50 mL を流し、上下のキャブをして返却する)

##### 2) タンパク質の UV スペクトル

採取した各分取用溶液を食塩濃度の薄い順に石英セルを用いて 380~250 nm まで UV スペクトルを取り、吸光度の大きな値の物にスペクトルを合同する。測定終了した溶液は元の試験管に戻し泳動試料とする。

##### 3) タンパク質ゲル電気泳動

マイクロチューブ立てに 8 本のマイクロチューブを並べ、50  $\mu\text{L}$  ずつサンプル Buffer を添加する。これに、1/5 混合タンパク質溶液と 7 種の分取用溶液計 8 点を 50  $\mu\text{L}$  ずつ添加し混合する。これにマイクロチューブホルダーを付け、熱水に 3 分間浸漬後、放冷（水冷するとチューブ内に水が入る場合がある）しホルダーを外す。泳動槽に泳動用ゲルを装填する。この場合、泳動槽のゴム板に接する泳動用ゲルのガラス板面に付着物がある物は、エタノールを含ませたキムワイブで良く拭き取る。水を加え 2~3 分待ち漏れがないことを確認後、ガラス上端より約 3 mm 下まで泳動用緩衝液を注入する。泳動用ゲルについているコームを傾け無いように両手で垂直に外し、1 mL マイクロピペッターを用いて、泳動用ゲルの各ウエル内を泳動用緩衝液で洗浄する。9 個のウエルに 8 種の泳動用試料と分子量マーカー 1 本を 20  $\mu\text{L}$  マイクロピペッターで各 5  $\mu\text{L}$  ずつ加える。150 V 定電圧にて電気泳動を開始し、電気分解による気泡が発生することを確認する。30~40 分後、泳動の先端である BPB の青色が泳動槽の下端近傍に降りていることを確認し、電源を切る。

#### 4) CBB 溶液による染色

電源が切れていることを確認し、コードを分離する。泳動槽のカバーを外し、ゲルをガラス板から切り取り、破らないように注意して水を入れたバットに移し、水を直接、ゲルに掛けないよう 5 分置きに水を換えながら水平回転振蕩器にて約 15 分間洗浄する。バットの水を切り、CBB 溶液を注入し水平回転振蕩器にて約一時間染色する。ゲルを水槽に移し、30 分置きに水を換え水平回転振蕩器にて約一時間洗浄する。ゲルを破らないよう注意しながら、ほうろくバットに移し、泳動パターンを確認後、デジカメにて記録し印刷する（ゲルは直ちに所定の場所に廃棄する）。

注意：この他、ゲル洗浄において電子レンジを使った簡易洗浄方式もあるので別刷りを参照する事。

### 5(C).3: 結果のまとめと設問

#### 5(C).3.1: 結果のまとめ

- (1) 横軸に分画番号、縦軸に 280 nm の吸光度をとったヒストグラムを作成せよ。
- (2) 各溶出画分の吸光度と SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分離パターンを比較して、分離が有効に行われたか否かを検証せよ。
- (3) 分離ゲルの上端(分離ゲルと濃縮ゲルの境界)から各泳動バンドの中心までの距離を測ることにより各バンドの泳動距離を求めよ。
- (4) 分子量マーカーの泳動結果について、横軸に泳動距離、縦軸に分子量の対数をとってプロットし、検量線を作成せよ。
- (5) 試料の各バンドの泳動距離から、上記の検量線によって分子量を決定し、それに基づいて分子を同定せよ。

#### 5(C).3.2: 設問

- (1) 各タンパク質のイオン交換カラムからの溶出順序を、等電点の値から説明せよ。
- (2) タンパク質は 280 nm に吸収極大を示す。この吸収は、どのアミノ酸に由来するか。
- (3) 下部電極は陽極か、陰極か。
- (4) サンプル Buffer 中のグリセリンの役目は何か。
- (5) サンプル Buffer 中の 2-メルカプトエタノールの役目は何か。