



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	二次元電気泳動
Author(s)	岩井, 優和; 皆川, 純
Description	3章 単離・精製・活性測定 6. タンパク質 d-1
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 381-383
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39170
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-055.pdf



6. タンパク質

d-1. 二次元電気泳動

岩井 優和¹⁾, 皆川 純¹⁾

光合成反応は多数のタンパク質によって支えられている。それらを網羅的に解析する際、一次元 SDS-PAGE では全てのタンパク質を分離することは困難であるため二次元電気泳動が行われる。本項では、一次元目に等電点電気泳動、二次元目に SDS-PAGE を用いた二次元電気泳動のプロトコルを紹介する。

Two-dimensional electrophoresis

Masakazu Iwai, Jun Minagawa

Two-dimensional electrophoresis (2DE) based on two different principles has been employed to separate many proteins. In this chapter, we describe a protocol for 2DE with isoelectric focusing (IEF) and SDS-PAGE of solubilized thylakoid membranes of *C. reinhardtii*.

6.d-1.1 背景

通常の一次元 SDS-PAGE ではバンドが重なり分離されないタンパク質も、二次元電気泳動(2DE)を行うことで分離できる可能性が高まる。一次元目の電気泳動に等電点電気泳動(IEF)、二次元目の電気泳動に SDS-PAGE が使われることが多い。光合成研究では BN-PAGE を一次元目に行う方法も見られる。注意する点は、異なる機会に得られた二枚の 2DE ゲルのタンパク質の量を比べることが難しい点である。また、一次元目にのせるタンパク質の量には限界があり、分離されたとしても少量のタンパク質であると CBB 染色では染まらないことが多い。そのためしばしば銀染色が行われるが、銀染色は定量性に乏しく、同一ゲル上であってもタンパク質の量を比べることはできない(この点を改善した染色法として Flamingo 染色が知られる。)このため、2DE は定性的な解析手段として用いられることが多い。最近、異なるタンパク質サンプル(例えば、ストレス前と後)を異なる蛍光染色でラベルし、それを混合し一枚の 2-DE ゲルで展開する方法も行われるようになった(2D-DIGE)。本稿では、緑藻クラミドモナスのチラコイド膜を 2DE で展開し、質量分析で LHC タンパク質の同定を行った例を示す。一次元目は等電点電気泳動、二次元目は SDS-PAGE を行う。疎水性の高い PS2 のコアタンパク質は Immobiline DryStrip に浸透しないなど、必ずしも目的タンパク質が展開されるとは限らない点に注意が必要である。PS2 コアタンパク質を IEF で分離する方法は Ka-

shino et al. (2007)¹⁾ を参照されたい。

6.d-1.2 プロトコル (Hippler *et al.*, 2001²⁾ を改変)

6.d-1.2.1 試薬

可溶化バッファー

2 M thiourea	1.5 g/10 mL
8 M urea	4.8 g/10 mL
4% (w/v) CHAPS	0.4 g/10 mL
20 mM Tris-base	24.2 mg/10 mL
30 mM DTT	46.2 mg/10 mL
0.5% (v/v) IPG buffer (GE Healthcare)	50 μ L/10 mL (pH の幅に注意)
0.05% β -DM	25 μ L of 20% DM/10 mL
Orange G	微量/10 mL

平衡化溶液 A

(※ Immobiline DryStrip 1 本につき 5 mL 必要)

50 mM Tris (pH 6.8/HCl)
6 M urea
30% (v/v) glycerol
2% (w/v) SDS
2% (w/v) DTT

平衡化溶液 B

(※ Immobiline DryStrip 1 本につき 5 mL 必要)

50 mM Tris (pH 6.8/HCl)
6 M urea

1) 北海道大学低温科学研究所

30% (v/v) glycerol
2% (w/v) SDS
2.5% (w/v) iodoacetamide
bromphenol blue 微量

6.d-1.2.2 装置など

- Multiphor II (GE Healthcare)
- Immobiline DryStrip (適した pH range を選択)
- IPG Buffer (適した pH range を選択)
- Immobiline DryStrip 膨潤トレー
- Immobiline DryStrip アライナー
- 等電点泳動トレー
- 等電点電極 (陰極・陽極)
- 等電点用電極ろ紙 (5 x 20 mm)
- シリコンオイル
- SDS-PAGE 用スラブ
- 2DE 用コーム (下図)

1 日目 (Immobiline DryStrip の膨潤)

1. タンパク質サンプル中のポリペプチドをクロロフォルム・メタノール法³⁾により沈殿させる。これにより色素を除き、その電荷が等電点電気泳動に影響するのを防ぐことができる。
2. Immobiline DryStrip (11 mm) 一本につき、0 ~ 100 μ g protein のポリペプチドサンプルを 230 μ L の可溶性バッファーで可溶化するため、室温で 1 時間インキュベートする。
3. 可溶性サンプルを 9,000 g 5 分間遠心する。
4. 200 μ L の上清を分取し、IPG buffer を 1 μ L 加える。※加えるバッファーの pH 幅に注意。
5. 上記サンプル溶液 200 μ L を膨潤トレーの溝に添加する。

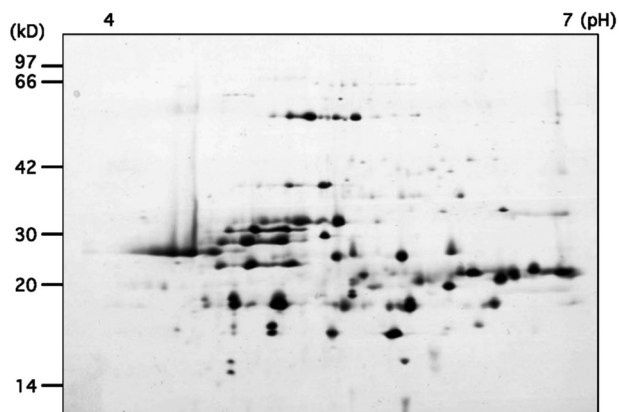


図1: クラミドモナス葉緑体タンパク質の2次元電気泳動 (IEF を一次元目 (横方向, SDS-PAGE を二次元目 (縦方向) に行った。

6. Immobiline DryStrip のゲル面を下にして、サンプル溶液が入ったトレーの溝にゆっくりと置く。Strip のゲルが溶液に完全に浸るよう注意する。
7. サンプル溶液の蒸発と urea の結晶化を防ぐため Strip の上を 2~3 mL のシリコンオイルで覆う。
8. トレーの蓋をし、12 時間室温で放置する。

2 日目 (一次元目の電気泳動: 等電点電気泳動)

1. Multiphor II の冷却プレートを 15°C に設定。
2. 冷却プレートの上に 2~3 mL のシリコンオイルをのせ、等電点泳動トレーをその上に置く。プレートとトレーの間に空気が入らないように注意する。
3. 12~15 mL のシリコンオイルをトレーの上にのせ、Immobiline DryStrip アライナーをトレーの上に置く。トレーとアライナーの間に空気が入らないように注意する。
4. 膨潤済みの Strip をアライナーの溝に置く。ゲル面は上。Strip の+側と-側に注意する。
5. 等電点用電極ろ紙を水で適度に湿らせる。
6. 湿らせたろ紙を Immobiline DryStrip の両端の上に置く (ゲルの両端から 3 mm 幅分を重ねれば充分)。
7. 陽極線と陰極線を湿らせたろ紙の上にセットする。
8. 120~150 mL のシリコンオイルをトレーに静かに注ぐ。
9. トレーの電極を Multiphor II の泳動槽に接続し、Multiphor II のフタを閉める。
10. 300 V/1 mA/5W で一時間泳動後、1400 V/1 mA/5W で 19 時間泳動を行う (合計 20600 Vh)。等電点電気泳動の場合、泳動時間の超過はさほど問題にならない。最初の一時間泳動後、Orange G が流れているのを確認する。

3 日目 (二次元目の電気泳動: SDS-PAGE)

1. 一次元目終了後、Immobiline DryStrip を取り出し、フィルム側についているシリコンオイルを拭き取る。
2. 取り出した Immobiline DryStrip は試験管などに入れる。二次元目を当日にやらない場合は、-80°C で保存する。
3. 試験管に平衡化溶液 A を加え、15 分間インキュベートする。
4. Strip を取り出し、ゲルに触れないようにフィルム側の平衡溶液 A をキムワイプなどで吸い取る。
5. 平衡化溶液 B が入った試験管に Strip を入れ、10 分間インキュベートする。

6. 2DE 用コームを使って、ゲルを作っておく
7. スタッキングゲルの上に Strip を挟み込む。
8. 通常通りに電気泳動を行う。この時、マーカ―や一次元目の等電点電気泳動で使ったサンプルを横に同時に流しておくの良い指標となる。

参考文献

- 1) Y. Kashino, Y., T. Harayama, H. B. Pakrasi, K. Satoh, J. Chromatogr. B **849** (2007) P.282.
- 2) M. Hippler, J. Klein, A. Fink, T. Allinger, P. Hoerth, Plant J. **28** (2001) P.595.
- 3) D. Wessel, U. I. Flügge, Anal. Biochem. **138** (1984) P. 141.