

実験 2

電気泳動による 光合成関連タンパク質の分離

目的：

タンパク質を分子量の違いによって分離する手法であるSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法の原理を理解し、その手法を習得する。

材料：

シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803
野生株および *cpcA* 遺伝子欠損変異株

実験：

(班単位でおこなう)

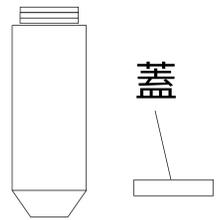
- A：野生株および *cpcA* 遺伝子欠損変異株の細胞を破碎後、タンパク質を電気泳動で分離し、フィコシアニンのバンドを同定、その分子量を推定する。
- B：分光光度計を用いて細胞の吸収スペクトルを測定することによりフィコシアニンが光合成に利用する光の波長を推定する。

実験A「電気泳動」の手順

(1) 泳動サンプルの調製 (個人ごと)

(1人2本：野生株と変異株を一本ずつ)

ねじ蓋付チューブ



専用スプーンで**1杯の半分ほど**
ガラスビーズをいれる。
入れすぎ注意!



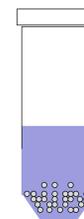
しっかり蓋をしめ破砕機にセット



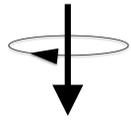
培養懸濁液をよく混合してから、
野生株または変異株を **2 mL** いれ、
蓋をする



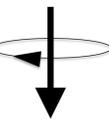
細胞破砕 (4,000 rpm, 40秒)



2×サンプルバッファー **100 μL**
を加えよく混合し、蓋をする



遠心 (15,000 rpm, 1分)



遠心 (15,000 rpm, 10秒)



蓋をあけ、マイクロピペットで
細胞を吸わないよう注意しながら
上澄み液をしっかりと除く



出来上がり!

細胞



沈澱にマイクロピペットで
100 μLの細胞破砕緩衝液を加え、
ピペッティングして再懸濁。

(2) 電気泳動 (班ごと)

1. 泳動用緩衝液を泳動槽の線のところまで入れる。
2. ゲル板よりコームをゆっくり垂直に抜き取る。
レーンの配列が乱れた場合、教員またはTAに申し出る。
3. ゲル板を泳動槽へとりつける(教科書参照)。
4. 上部槽の上端から2-3 mmのところ、**ウェルが完全に浸るまで**泳動用緩衝液を入れる。
5. マイクロピペットで、両端のレーンには分子量マーカーを**8 μ L**、その間のレーンに各自のサンプル**8 μ L**を、ビーズをなるべく吸わないように上の方から吸い、ゆっくり流し込む。
(全てのレーンを埋めた方がきれいに泳動できる)
6. 電源部の泳動槽への取り付けをおこなう(教科書参照)。
7. メインスイッチOFFを確認してからACアダプターをコンセントに差し込み、メインスイッチをONにする。
Tris-Gly PAGELのHighモードが選択されていることを確認する。
8. RUNボタンを押し、泳動を開始する。
泳動は、30分経つと自動的に終了する。

泳動の30分間に実験Bをおこなう。

(3) ゲルの染色、脱染 (班ごと)

手袋をして操作すること

1. 泳動終了後、泳動用緩衝液を流しに捨て、泳動槽からゲル板を取り出し、軽くゲル板全体を水洗した後、スパテルを使ってゲル板をはがす (裏表が分かるようにゲルの右下を切っておく)。
2. ゲルをゲル板からはがし染色用ガラス容器に入れる。50 mLチューブの染色液全量 (約30 mL)を加え、フタをした後、電子レンジにセットし、加熱処理する。(あたためモード約30~40秒が目安)。火傷に注意。容器を振とう機に置き、約10分間振とう。染色液をスポイトを使って50 mLチューブに必ず戻す。
3. 容器に水道水を50 mL程度加え (量り入れる必要はない)、2. と同様に電子レンジで加熱処理後、約10分間 (バンドがはっきり見えるようになるまで) 振とう。
※脱染水は指定の容器に廃棄。絶対に流しに捨てない。
4. ゲルを写真に撮る
(撮影方法については教員の指示に従うこと)。

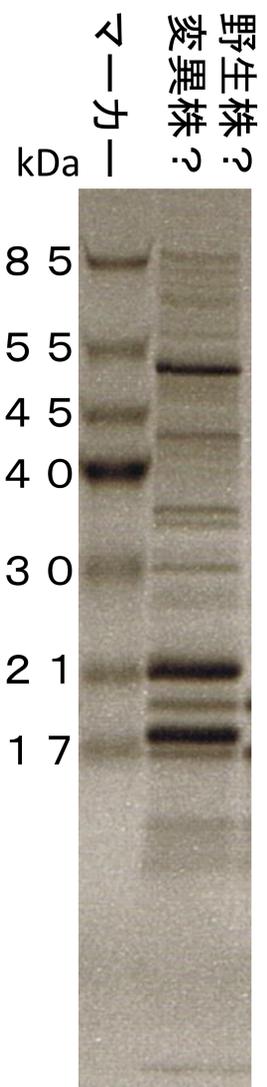
実験B 「吸収スペクトルの測定」 (班ごと)

1. 野生株(WT)又は変異株(MT) 培養懸濁液 1 mLを測定用セルに入れ、測定を行う。
あらかじめ培養懸濁液をよく混合してから、マイクロピペットを用いて懸濁液を分取する。(ベースラインは事前に教員が補正済みなので、培養懸濁液の測定を行うだけでよい)
2. シアノ廃液入れに細胞を捨てた後、セルを蒸留水(DW) でよくすすぐ。

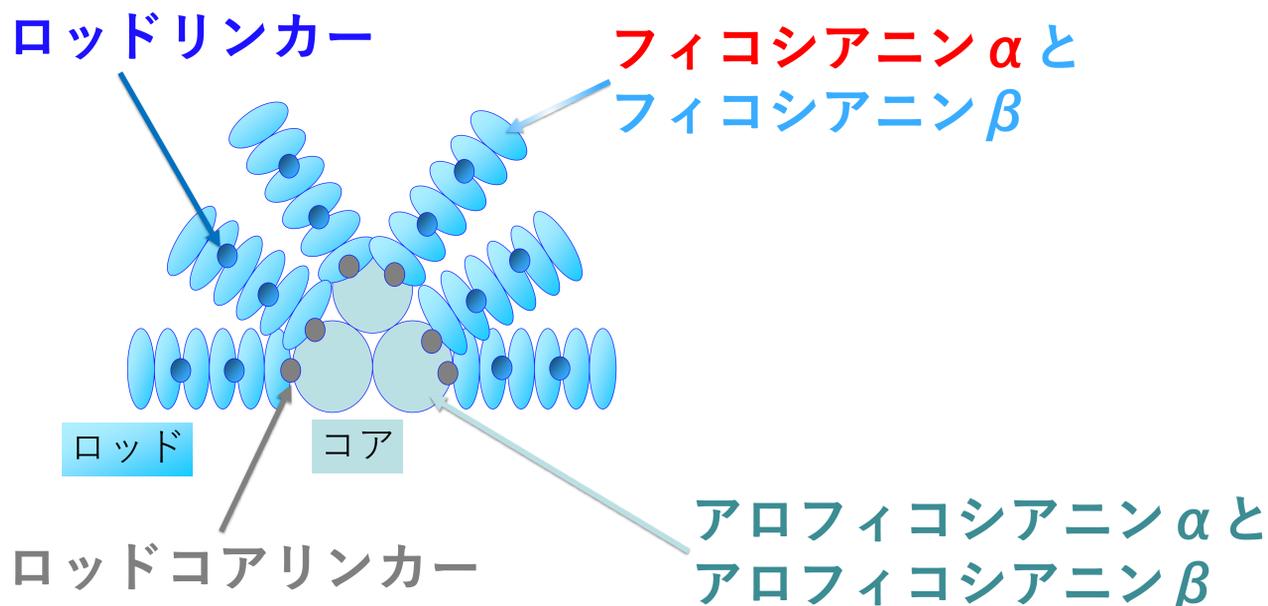
参考資料

表 1 (教科書 p.30)

タンパク質名称	みかけの分子量 (kDa)	存在場所
ロッドリンカー	34	ロッド
ロッドリンカー	33	ロッド
ロッドコアリンカー	30	ロッドとコアの間
フィコシアニンβ	21	ロッド
アロフィコシアニンα	18.5	コア
フィコシアニンα	17.5	ロッド
アロフィコシアニンβ	17	コア



図：電気泳動におけるマーカーの分子量



図：野生株のフィコビリソームの構造

後かたづけ

泳動槽

水で洗ったあと、実験机上に逆さにして乾かす。

染色用ガラス容器

水洗後、各自の実験机に逆さにして乾かす。

ビーズの入った容器

各自の実験机に置く。

使用済ジェル板

軽くすすいで、所定の机の指定容器に捨てる。
包装袋とコームは不燃ごみ。

使用済ねじ蓋付チューブ

指定容器にフタを閉めて捨てる。

15 mlチューブ（野生株・変異株用）

水洗→蒸留水ですすいだ後、野生株・変異株を分けて、所定の机の洗い桶に逆さにして乾かすように入れる。

プラスチックセル（分光器）

純水すすぎの後、逆さにして各自の実験机上に立てておく。

レポートの内容

○タイトル、目的、材料と方法（生物名）

○結果

A)電気泳動

- 写真の余白を切り取って糊付け。
- 実験A課題1～3

課題1：フィコシアニンaのバンド特定とその特定理由

課題2：変異株でフィコシアニンa以外に失われたタンパク質の特定

課題3：変異株ではフィコビリソームの構造がどのようになっているか、図と文章で説明せよ

2) 細胞の吸収スペクトル

- 写真の余白を切り取って糊付け。
- 株の種類と読み取った吸収ピークの波長を記載。
- 実験B課題1（問いが3つあるので注意）
 1. シアノバクテリアが光合成に利用している波長の推定
 2. 野生株と変異株の見た目の色の違いが生じた原因を、吸収スペクトルの違いから噛み砕いて説明せよ
 3. フィコシアニンが吸収する光の波長

○考察

- 変異株において失われた、フィコシアニンa以外のタンパク質は、フィコシアニンaとどのような関係にあるか答えよ。また、変異株においてそれらのタンパク質が失われたのはなぜか、考えるメカニズムを答えよ。ただし、変異株ではcpcA遺伝子以外の遺伝子には変異が生じていないものとする。
- 変異株が得られた経緯を考慮した上で、cpcA遺伝子に生じた変異はどのような環境に対して適応的な変異であると考えられるか、理由も含めて答えよ。