プロテオミクス実験法・同実習に参加して

森　本　晃　平
Kohei MORIMOTO
数理情報学専攻修士課程　1 年

1. はじめに

平成 27 年 9 月 4 日から 6 日まで広島大学で行われた「プロテオミクス実験法・同実習」の講義に参加しました．この講義は，広島大学と明治大学との協定による単位互換科目です．広島大学，明治大学，龍谷大学の学生が約 20 名受講しました．

2. 実験の内容

与えられたサンプルに含まれるタンパク質が何であるかを質量分析という方法を用いて特定する実験を行いました．

3. 実験方法

3.1　ゲルの切り出しと洗浄

まず，青色に染色されたタンパク質を含んでいるゲルをカッターで切り出し，ピンセットを使ってマイクロチューブに移します．このとき，切り出したゲルを細かく切り分けておくと，後に行うゲルの洗浄を効率よくすることができます．カッターやピンセットは使うたびにアルコール消毒を行います．この中に 50% アセトニトリル 100 µl を加え，よく攪拌し，その後溶媒を取り除くことで，ゲルの洗浄を行います．この作業をゲルの色が透明になるまで繰り返します．

3.2　脱水によるゲルの収縮

ゲルを入れたマイクロチューブの中に 100% アセトニトリルを 100 µl 加え，5 分間よく攪拌します．攪拌後は溶媒を取り除きます．マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせ，穴を開けます．これをデシケータの中に入れ，真空ポンプで減圧乾燥します．

3.3　還元・アルキル化

10 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 100 µl（直前調製）を加えます．ヒートブロックを用いて，1 時間 56℃ でインキュベートし，その後，室温に戻し溶媒を取り除きます．次に，55 mM ICH_2CONH_2 in 25 mM NH_4HCO_3 100 µl（直前調製）を加え，45 分間室温で攪拌します．この後，溶媒を取り除きます．

3.4　DTT と ICH_2CONH_2 の除去

まず，この操作では 25 mM NH_4HCO_3 100 µl を加え，5 分間よく攪拌します．そして，溶媒を取り除きます．この操作を 2 回繰り返します．

3.5　脱水によるゲルの収縮

100% アセトニトリル 100 µl を加えよく攪拌し，10 分間静置します．この後，溶媒を取り除き，マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせ，穴を開けます．ゲルをデシケータに入れ，真空ポンプで減圧乾燥します．

3.6　消化

クーラーボックス上の氷でゲルを冷却します．酵素溶液（25 mM NH_4HCO_3, 12.5 ng/µl　トリプシン）（直前調製）をゲルが膨潤する程度（通常 5～10 µl）加えます．10 分間，氷の上で放置し，ゲルの膨潤の程度を確認します．もし，ゲルの膨潤が足りないようであれば，蒸留水を加えることで補います．そして，インキュベートします．

3.7　抽出

0.1% TFA, 75% アセトニトリル 20 µl を加え，10 分間攪拌し，次に 10 分間静置します．この中から，0.5 µl を質量分析で測定します．

4. 結果

今回，実験で扱ったタンパク質は 5 種類でしたが，4 種類のタンパク質の種類を知ることができました．タンパク質の名称はそれぞれ，Ovalbumin, Carbonic anhydrase, Serum albumin, Glycogen phosphorylase でした．

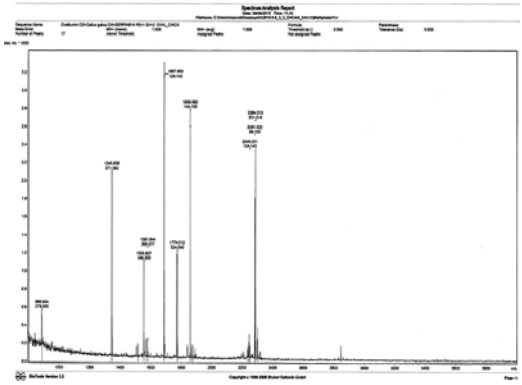

図 1　Ovalbumin の分析結果

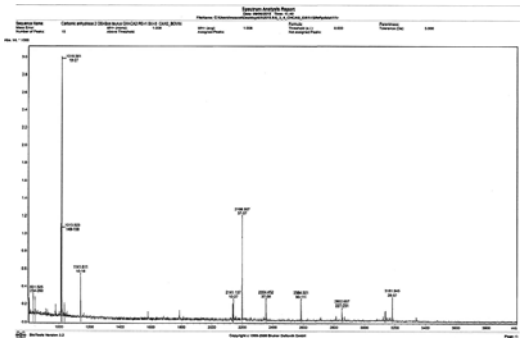

図 2　Carbonic anhydrase の分析結果

5. おわりに

今回，「プロテオミクス実験法・同実習」に参加して，実験に関しては手順が記載されている資料に従って進めていくのですが，実験方法や実験器具など初めて扱うものが多く，講義が始まるまではうまくできるのか不安でした．しかし，同じ班の人と互いに協力することで，無事に実験を終えることができました．広島大学の方は実験をよく行っているそうなので，実験器具の扱い方など丁寧に教えてくれました．

この講義は，広島大学や明治大学の学生の方と交流するよい機会であり，お互いにどんな勉強をしているのか，研究はどのようなテーマであるのかなど多くの話をすることができました．普段，なかなか聞くことのできない話を聞くことができたのでとても有意義な時間でした．私の研究では，実際に実験を行って結果を得ることはないため，貴重な体験をすることができました．この集中講義に参加したことによって，他大学の学生と交流を深めることができ，また，研究活動の話を聞くことで自分自身の知識を深めることができました．この経験を活かし，今後の研究に役立てられるよう勉強していきます．