

広島大学単位互換プログラム プロテオミクス実験法・同実習 に参加して

山田 貫太

Kanta YAMADA

数理情報学専攻修士課程 1年

1. はじめに

私は、2016年9月1日から3日間、広島大学東広島キャンパスにて開催された「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、広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻と龍谷大学大学院理工学研究科数理情報学専攻との間で締結された大学間交流に関する包括協定に基づいた「単位互換プログラム」です。今年はこの講義に龍谷大学大学院の学生9名が参加しました。

2. 実験・講義内容

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解析という方法を用いて特定する実験を行いました。1日目の午前に少し講義がありその時間に、この実験内容の説明や理論の説明がありました。また講義では実験内容の話ばかりではなく、交流などを含めた話をする時間も含まれていました。

3. 実験方法

3.1 ゲルの切り出し

1. A4の紙を敷いた上にOHPシートをのせる。
2. OHPシートの上に蒸留水をたらし、ゲルをのせる。
3. アルコールスプレーでカッターの刃をよく洗う。
4. ゲルをカッターで切り出す。

3.2 ゲルの洗浄

1. 切り出したゲルスポットをピンセットでマイ

クロチューブに移す。

2. 50% アセトニトリル 100 μl を加える。(5分間よく攪拌)
3. 溶媒を取り除く。
4. 3.2の操作2~3をゲルの色が消えるまで繰り返す。

3.3 脱水によるゲルの収縮

1. 100% アセトニトリル 100 μl を加える。(5分間よく攪拌)
2. 溶媒を取り除く。
3. マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせ穴をあける。
4. ゲルをデジケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥する。

3.4 還元・アルキル化

1. 10 mM DTT in 25 mM NH_4HCO_3 100 μl (直前調製) を加える。
2. ヒートブロックを用いて、1時間56°Cでインキュベートする。
3. 室温に戻す。
4. 溶媒を取り除く。
5. 55 mM $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ in 25 mM NH_4HCO_3 100 μl (直前調製) を加える。
6. 45分、室温で攪拌する。
7. 溶媒を取り除く。

3.5 DTT と $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ の除去

1. 25 mM NH_4HCO_3 100 μl を加える。(5分間よく攪拌)
2. 溶媒を取り除く。
3. 3.51の操作1~2を2回繰り返す。

3.6 脱水によるゲルの収縮

1. 100% アセトニトリル 100 μl を加える。(攪拌の後10分間静置)
2. 溶媒を取り除く。

3. マイクロチューブの上にパラフィルムをかぶせ、穴をあける.
4. ゲルをデジケータに入れ、真空ポンプで減圧乾燥する.

3.7 消化

1. クーラーボックス上の水で冷却する.
2. 酵素溶液 (25 mM $NH_4 HCO_3$, 12.5 ng/m μ l トリプシン) (直前調製) をゲルが膨潤する程度 (通常 5~10 μ l) 加える.
3. 10 min 放置する. (氷上)
4. もし膨潤が足らなければ蒸留水を加える.
5. インキュベートする.

3.8 抽出

1. 0.1% TFA, 75% アセトニトリル 20 μ l を加える. (10 分間攪拌, 10 分間静置)
2. この 0.5 μ l を質量分析で測定する.

4. 結果

CHCA はペプチドを測定する標準的なマトリックスなのでマトリックスは CHCA を選択した.

maildi tof mass を使用し、測定した結果、配布された 1 レーン分のタンパク質は以下であることが分かった.

1. Ovalbumin
2. Carbonic anhydrase
3. Trypsin Inhibitor
4. Lysozyme

5. おわりに

この講義を担当して下さった泉俊輔先生や、広島大学の学生の方々にはとても親切に頂きました。理工学部数理工学専攻では、普段経験できない実験を行い貴重な体験をすることが出来ました。他の分野の研究を行っている方と交流する良い機会でもありました。この講義で行う実験は自分たちが普段は全くやらないような実験で最初は戸惑いましたが、広島大学の方にとっても丁寧に教えていただき終えることが出来ました。最後になりましたが今回の講義に参加するにあたって、ご協力して下さいました広島大学、龍谷大学の先生方に深く感謝いたします。