

海洋生化学演習

令和 3 年 5 月 22 日(土)~23 日(日)

氏名	
----	--

タイムスケジュール

	1. 海藻の色素	2. タンパク質の分離	3. Polymerase Chain Reaction (PCR) 法	4. 食品生化学実験
22日	09:30 実験内容の説明 10:30 光合成色素の分離実習 12:30 終了予定			
	昼食 12:30-13:30			
		13:30 ピペット操作講習 13:45 実験内容の説明 14:00 電気泳動準備 14:15 電気泳動開始 14:45 ゲルの染色・脱色・説明 15:30 終了予定	15:45 実験内容の説明 PCRについて説明 16:15 PCR反応液の調整 16:45 反応の開始 17:00 DNA電気泳動についての説明 17:30 DNA電気泳動の練習 18:00 PCR反応(翌日まで)	
23日			09:30 反応物回収とDNA電気泳動 10:30 結果の説明 10:55 終了予定	11:00 食品生化学実験 12:00 食品生化学の講義の概要記入 海洋生化学演習全体のアンケート記入 12:30 終了予定

講師

鈴木信雄 教授

関口俊男 准教授

木谷洋一郎 助教

谷内口孝治 連携研究員

川村龍矢 ティーチングアシスタント 修士 1 年

1. 海藻の色素

1.1 クロマトグラフィー

1903年にツヴェットがはじめて植物色素を分離したときの実験を図1に示した。複数の植物色素がガラス管に充填された CaCO_3 中を石油エーテルで展開されていく際、各色素の移動速度の違いで色の違う帯となって、ガラス管の出口で分離されている。クロマトグラフィーという言葉自体が、色を表す「クロモ」からの造語としてツヴェットにより初めて用いられた。

すべてのクロマトグラフィーという分離手法において、この例が示すような分離の原理は同じである。カラム(この場合はガラス管)のなかに充填剤があり、充填剤そのもの、あるいはその表面に化学的に固定された(物理的に塗布された場合もある)官能基を固定相と呼ぶ。そのなかを移動相と呼ばれる流体が移動し、その流れに混合物試料が導入される。複数成分からなる試料は、各成分と固定相、移動相の親和力(分配係数)の違いによって移動速度が異なり、結果的に各成分が相互に分離される。

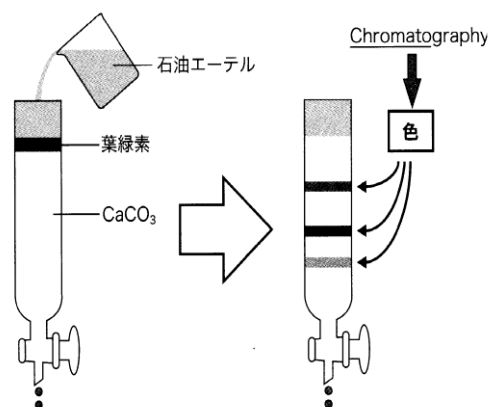


図1 クロマトグラフィーの概念図

ベーシック機器分析化学(化学同人)より

薄層クロマトグラフィー (Thin-Layer Chromatography :TLC) とは、充填剤(担体)を薄膜上に固定した薄層プレートを用いたクロマトグラフィーのことである。

1.2 海藻の垂直分布

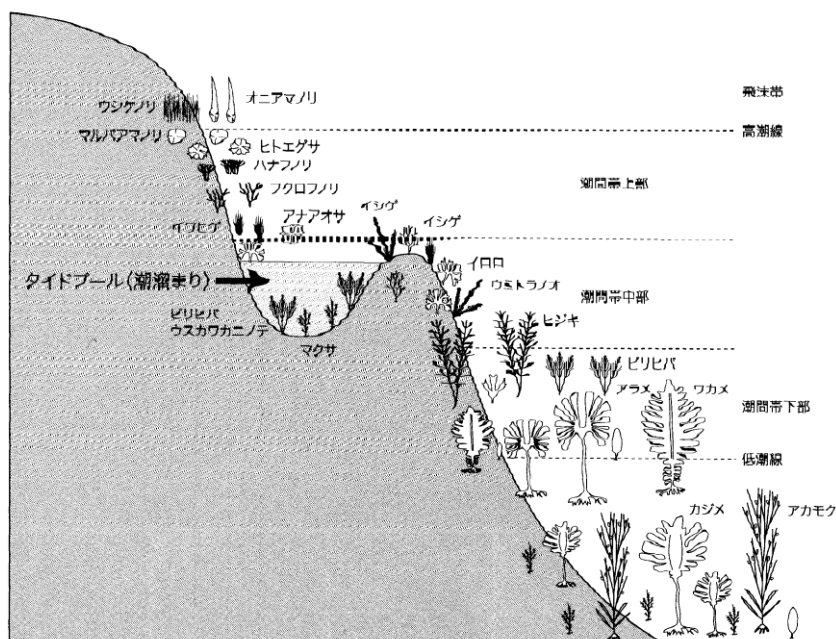


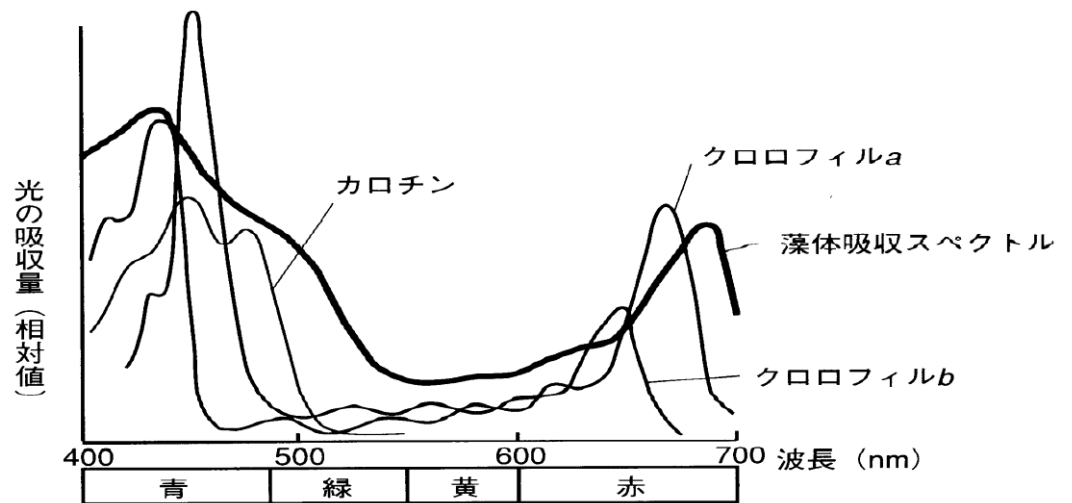
図2 潮間帯の垂直分布

(伊豆下田の例)

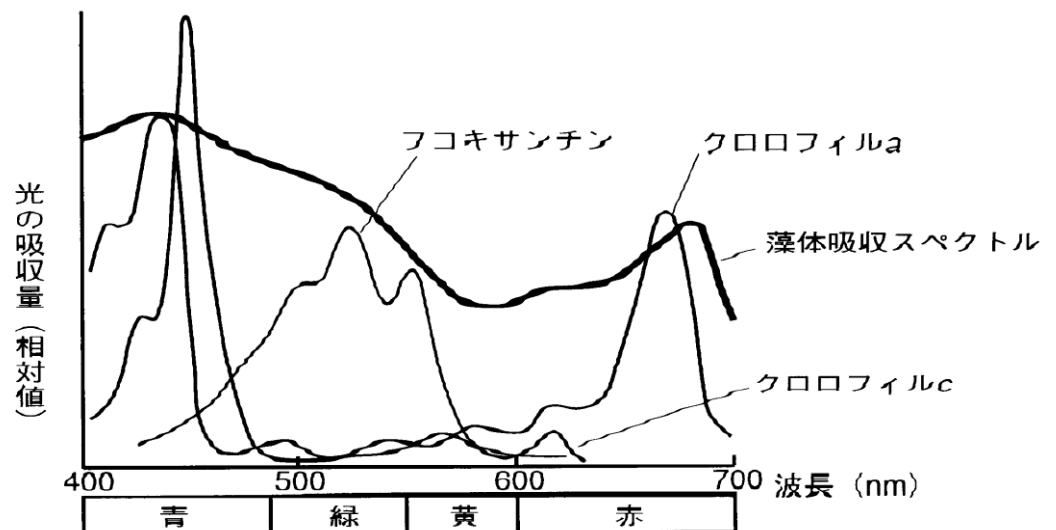
藻類30億年の自然史(東海大学出版会)より

1.3 光合成色素の吸収スペクトルと構造

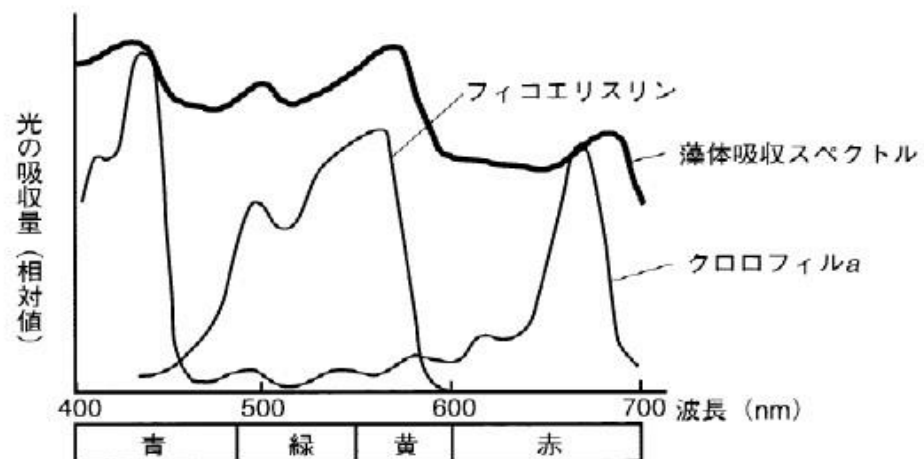
緑藻



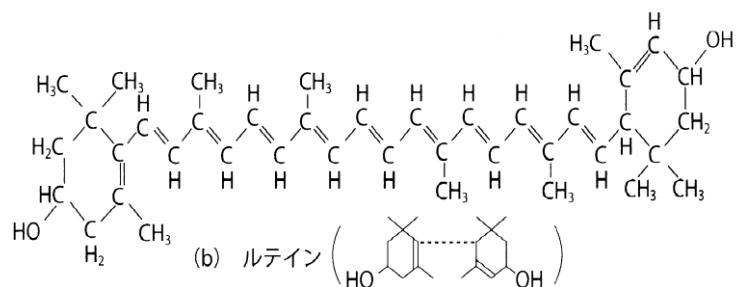
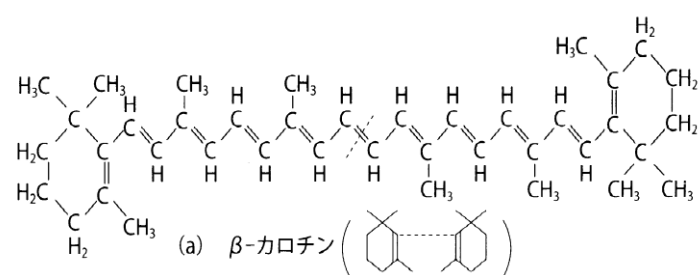
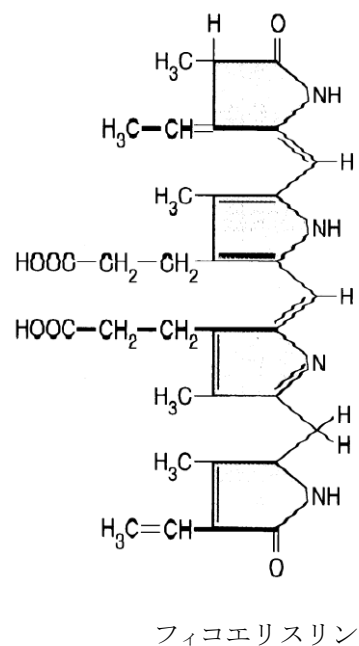
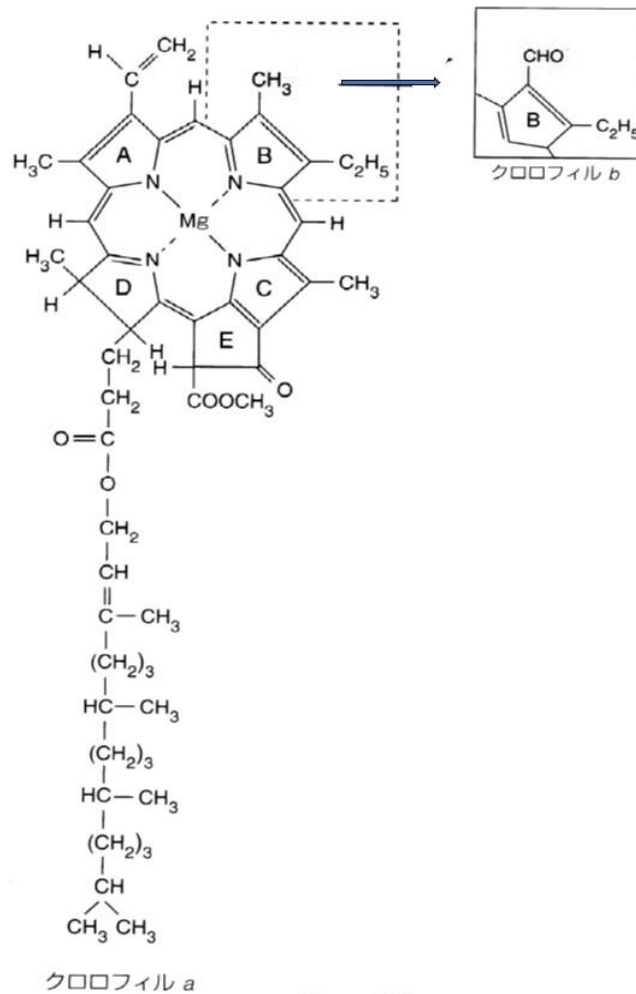
褐藻



紅藻



スペクトルの図は藻類30億年の自然史(東海大学出版会)より



構造式はティツ・ザイガー原著植物生理学（培風館）より改変と植物生理学入門（オーム社）より

1.4 薄層クロマトグラフィーによる光合成色素の分離

目的

陸上植物の光合成に関与する色素は緑色が基本であるが、海藻の場合は多様性があり、目で見ても藻体は様々な色をしている。そのため色をもとに緑藻や褐藻、紅藻と分類されてきた。そこで、海藻から光合成色素の分離を行い、その多様性の実態を調べその意義を探究する。

器具・材料

乳鉢、ハサミ、ビーカー、ピンセット、葉サジ、薄層プレート、シリカゲル、ジエチルエーテル、キャピラリー、展開槽（展開液を含む）

緑藻：アナアオサ、ボウアオノリ
褐藻：ヤツマタモク、ノコギリモク
紅藻：ユナ、フシツナギ
陸上植物 スイバ、白クローバー

方法

シリカゲルとともに藻体をすりつぶした後、ジエチルエーテルで光合成色素を抽出し、薄層クロマトグラフィーで分離を行う。

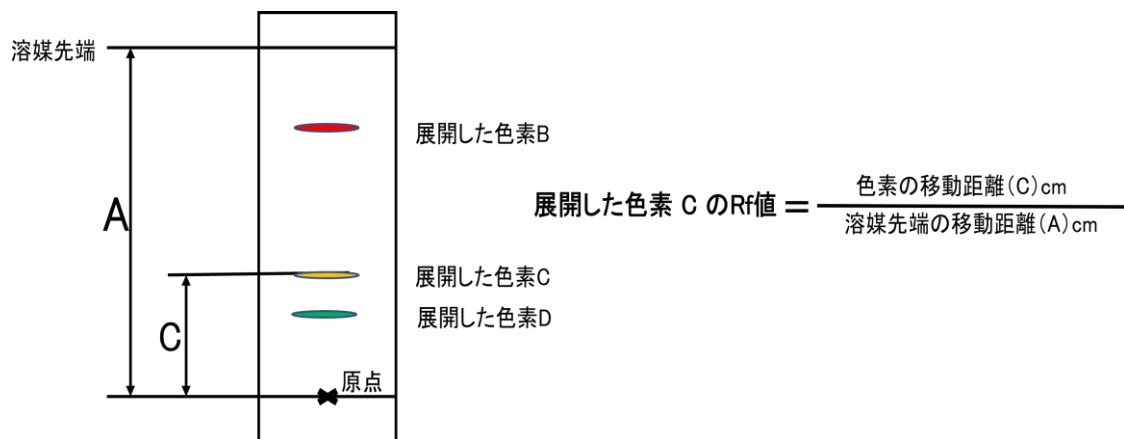
- (1) 試料約 10 cm² をハサミで細かく刻み、乳鉢に入れる。
- (2) シリカゲルを葉サジ(大)3杯程度加え、よくすりつぶす。
- (3) すりつぶしたシリカゲル粉末がベトベトした状態であったら、シリカゲルを追加してよくすりつぶす。
- (4) すりつぶした藻体を含むシリカゲル粉末(パウダー状)を葉サジでビーカーにかき落とす。
- (5) この粉末の入ったビーカーに、ジエチルエーテル数 ml（粉末量のおよそ2割増し）を加え、ゆるく振り色素を抽出する。その後、抽出液を試験管に移し替える（室外で行う）。
- (6) 【別室作業】試験管にN₂ガスを吹き付け、溶媒を飛ばし濃縮させる。乾固はさせない。濃縮したサンプル液を試験管からエンペンチューブに入れ替える。
- (7) 10 x 10 cm のシリカゲル薄層プレートの下端から約 2 cm の位置（鉛筆で横線のしるしを付ける）にそれぞれ（6）で濃縮したサンプル液をスポットする。点着はキャピラリーで数 μ l を少しずつ行う。プレートのスポット液が乾いたら作業を繰り返す（スポットの拡がりか 5mm 以下になるように 5～6 回前後繰り返す）。プレートは 2 枚ずつ作成する。必ず防護メガネをかけて行う。
- (8) あらかじめ展開液（石油エーテル(7 容)・アセトン(3 容)混液）・（石油エーテル(6.5 容)・アセトン(3.5 容)混液）が入った展開槽を用意する。それぞれ点着した薄層プレートは、展開液の入った展開槽にスポット側を下方にして立てかける（ピンセット使用）。その後展開槽の蓋をする。

- (9) 溶媒前線が薄層プレートの上端から約 1 cm の位置に達したら、プレートを取り出し、前線および各色素の位置を鉛筆で印をつける。

実験上の注意

- 1 光合成色素の分離実験ではジエチルエーテルを使うので、火気厳禁であり、換気は十分行う。
- 2 薄層プレートは各班 4 枚とするので、一人あたり 2 枚スポットする。

Rf 値の求め方



クロロフィルの定量

クロロフィル類を抽出し、最終的に 80%アセトン(2.5mM リン酸ナトリウム緩衝液 PH7.8 でアセトン希釈する)中で 750nm、663.6nm、646.6nm の 3 波長において吸光度を測定し、663.6nm、646.6nm のそれぞれの値からバックグラウンドとして 750nm の値を差し引いた値を用いて計算する。

$$\text{クロロフィル a}(\mu\text{g/ml}) = 12.25 \times (A_{663.6}) - 2.55 \times (A_{646.6})$$

$$\text{クロロフィル b}(\mu\text{g/ml}) = 20.31 \times (A_{646.6}) - 4.91 \times (A_{663.6})$$

2. タンパク質の分離

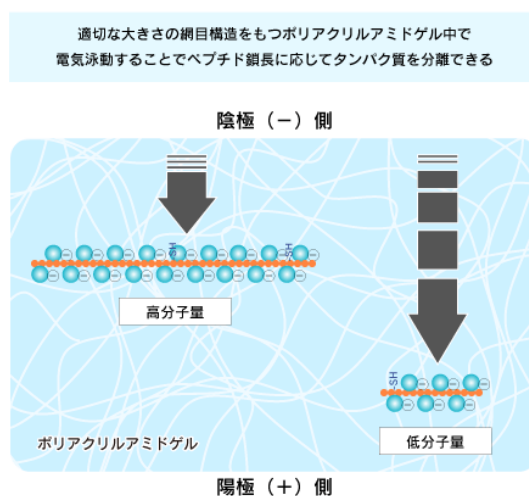
生物は様々な物質が複雑に機能することで生命活動を維持している。本項目は生体構成物質の一つであるタンパク質に着目し、その性質を学ぶ。

タンパク質とは

タンパク質は20種類のアミノ酸がペプチド結合により結合した物質で、生命の維持に必要な生体内の物理・化学反応の主役を果たしている。すべてのタンパク質は遺伝情報(DNA上の塩基配列)に従ってアミノ酸から合成される。タンパク質の性質はこのアミノ酸配列に加え、その立体構造によって特徴づけられる。

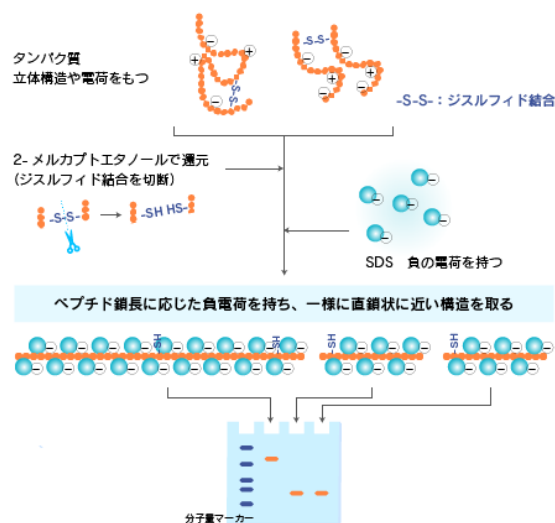
ゲル電気泳動によるタンパク質の分離

電気泳動とは"ある荷電粒子を電場内に置くと、粒子がその荷電の種類に応じて移動を始める"という現象を指しており、直流電圧を印可した電解質中では正に荷電した分子は陰極へ、負に荷電した分子は陽極へ移動する。ゲル電気泳動において移動度の違いは荷電の違いのほかに、ゲルに対する抵抗力が挙げられる。ゲルは分離したいタンパク質分子に対して"ふるい"のように機能し、小さなタンパク質分子は素通りし、大きなタンパク質に対しては大きな抵抗となり移動しにくくする。ゲルはアガロース(多糖類)やポリアクリルアミド(合成樹脂)などから作られる。



SDS-PAGEの原理

SDS-PAGEはタンパク質分子をドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で変性した後にポリアクリルアミドゲル(PAG)で電気泳動(E)する分離法である。SDSはタンパク質分子に対して多量に結合できるため(タンパク質1gに対して1.4g)、タンパク質の立体構造を破壊し直鎖状のポリペプチド鎖に変性する。これはタンパク質分子量の違いがポリペプチド鎖長の違いとして現れることを意味する。またSDSは負に荷電しているため、タンパク質それぞれが持つ固有の荷電を無視することができ、すべてのタンパク質は陽極に向かって移動する。この二つの特徴により、タンパク質は分子量によってのみ分離することが可能となる。



タンパク質の可視化

SDS-PAGEで分離したタンパク質は着色していないことが多く、通常直接見ることはできない。そこでタンパク質を特異的に染色する方法で分離されたバンドを可視化する必要がある。本項目ではクマシーブリリアントブルーR250を用いた染色を行う。

データの解析

分子量が既知のマーカータンパク質を同時に電気泳動することで、相対的に目的バンドのサイズを算出することができる。マーカータンパク質各バンドについて、原点からの移動距離を横軸とし、分子量を対数に変換し縦軸とした片対数プロットを行うことで回帰直線を算出する。その後、分子量未知の目的タンパク質について移動距離を測定し、これを回帰直線に代入することで分子量を算出する。

染色されたゲルはデジタルカメラやフラットヘッドスキャナ等でコンピュータに取り込むことで画像解析を容易に行うことができる。

タンパク質電気泳動法の応用

SDS-PAGEで分離したのみでは目的分子のサイズが算出されるだけである。複雑に混合している試料から目的の分子を特定するにはゲル中のタンパク質について構造解析を行う、もしくは特異抗体の抗原交差性を調べることにより同定を行うことができる。また、タンパク質固有の電気的性質を利用した等電点電気泳動や非変性PAGEなどを組み合わせることで同一の分子量を持った別種のタンパク質を分離することもできる。これは二次元電気泳動法と呼ばれ、タンパク質の網羅的分析に用いられる。

魚貝類筋肉タンパク質について

水産物はわが国では貴重なタンパク質源であり、その大部分は筋肉に由来する。魚貝類筋肉タンパク質は、中性塩に対する溶解性の違いから水溶性、塩溶性および不溶性の3つのタンパク質に分けることができ、これらの性質や量の変化は水産加工品の物性に大きな影響を与える。水溶性タンパク質は筋形質タンパク質とも呼ばれ、代謝エネルギーの源であるアデノシン5'-三リン酸(ATP)の産生に関与する酵素タンパク質を多く含む。また塩溶性タンパク質は筋収縮に関与する筋原線維タンパク質で構成されることが知られている。そして不溶性タンパク質はコラーゲンに代表される結合組織由来の筋基質タンパク質を含んでいる。

魚貝類筋肉タンパク質の分離

生体を構成するタンパク質は多岐にわたる。それぞれのタンパク質について詳しく知るためには、それぞれを純粋な物質として得る必要がある。タンパク質を分離するメカニズムは様々であるが、溶解性の違い、分子量の違い、電気的性質の違い、の3種に大別できる。本項目では前述したとおり中性塩溶液に対する溶解性の違いと分子量の違いによるタンパク質の分離法について実習する。

参考

水産・食品化学実験ノート 落合ら 恒星社厚生閣
新生化学実験講座1・タンパク質 I 日本生化学会編 東京化学同人
MBLホームページ <http://ruo.mbl.co.jp/bio/support/method/sds-page.html>

3. Polymerase Chain Reaction (PCR) 法

3.1 PCR法とは

PCR とは、Polymerase Chain Reaction（ポリメラーゼ連鎖反応）の頭文字をとったもので DNAを合成する反応の一つである。鋳型となるDNAと相補的に結合し、反応の基点となる任意のプライマーを合成することで、プライマーで挟まれた特定の配列を増幅することができる。

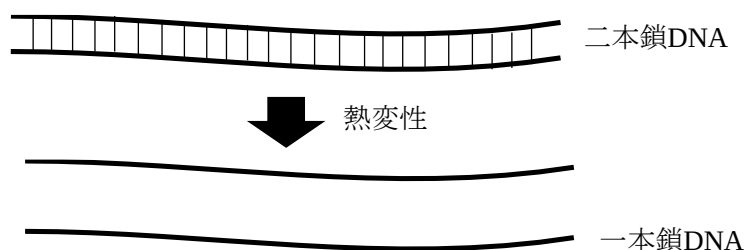
非常に感度の良い方法であり、わずか数時間で、目的の配列断片を20～50万倍に増幅することができる。このような利点を活用し、生命科学研究をはじめ、食品の品質検査、医療診断、犯罪捜査など多様な分野で用いられている。

<原理>

PCR 法は、以下のように3つのステップで構成されている。

1) DNAの熱変性ステップ

増幅しようとする目的の2本鎖DNAを90～98℃といった高熱にさらすことにより、相補的な2本鎖DNAをそれぞれ1本鎖DNAとする。



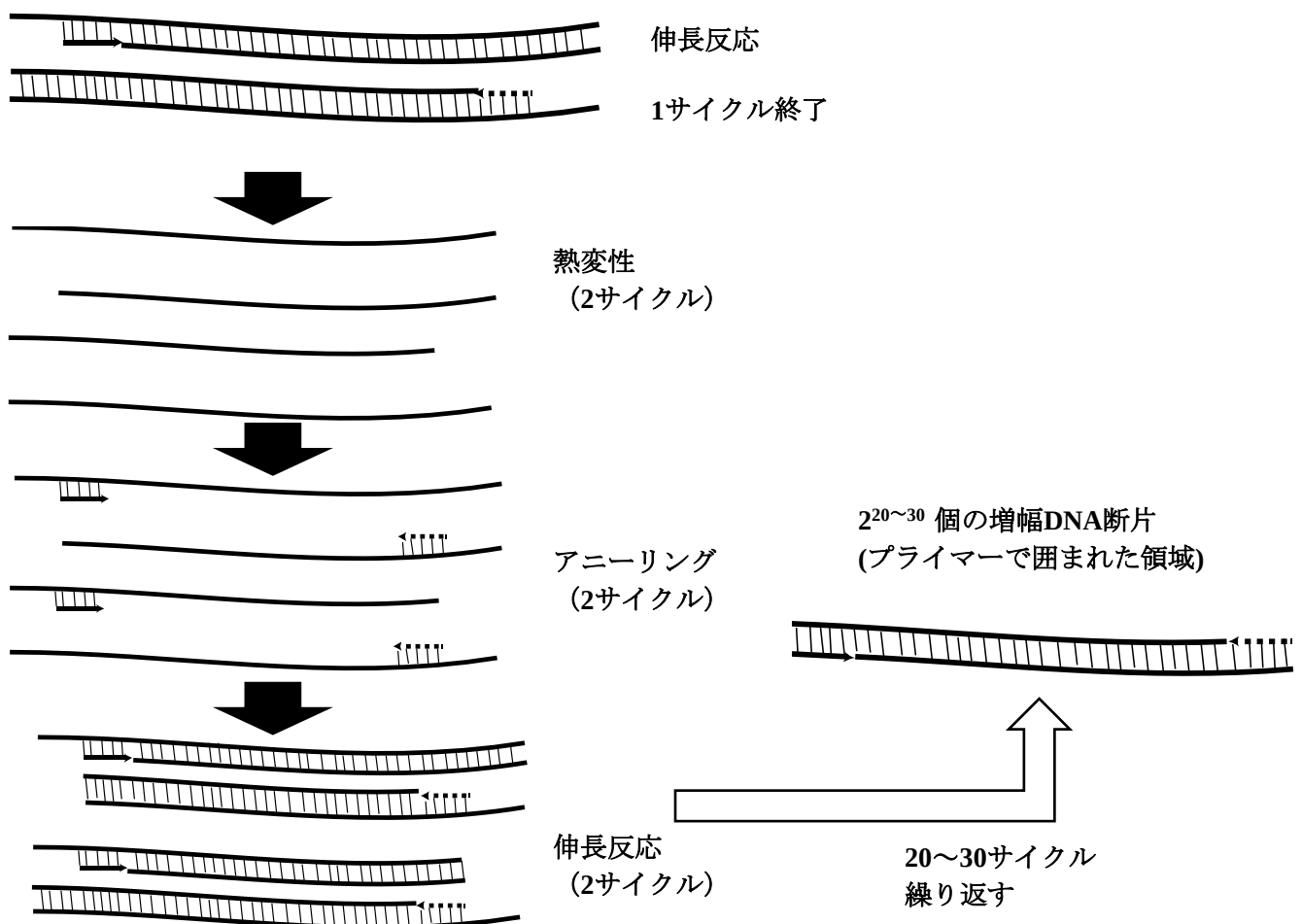
2) プライマーとのアニーリングステップ

目的のDNA鎖（これを鋳型DNAという）の中で、増幅したい領域をはさみこむようにして、鋳型DNAと結合できる配列を持った2種類のDNA（このDNAの長さは短く、約20塩基対で構成されている）をあらかじめ合成しておく。これをプライマー（もともとは爆薬の導火線などの点火薬を示す。ここではDNA同士の重合の開始点として作用する分子の意味）という。続いて、これらのプライマーを、高熱処理で1本鎖になったDNAと共存させて、温度（通常50～60℃前後）を下げると、2種類のプライマーはそれぞれ1本鎖鋳型DNAとアニーリング（1本鎖DNA同士が2本鎖分子を作ること）を起こす。



3) プライマーの伸長反応ステップ

DNAを構成している4種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP: dGTP, dATP, dTTP, dCTP) の存在下で、DNAポリメラーゼ (DNA合成酵素) を作用させると鋳型DNAの塩基配列に従いプライマーの伸長反応が始まり、プライマーを含む新しいDNA鎖がそれぞれ合成される。この過程は、68～72℃で行われる。反応時間は、合成する産物の長さに依存する。長いDNAを複製したい時は、長時間の反応が必要である。新しく合成されたDNA同士は、再び2本鎖を形成するので、次のサイクルに入るには、熱変性させ、1本鎖DNAにして同様のステップを繰り返す。このようにして、20～30サイクル行うことにより、理論的には、2の20～30乗個のDNAが増幅できる。



3.2 PCR によるメダカの雌雄判定

雄もしくは雌のメダカから抽出したDNA溶液を各自に1つ配布する。配布したサンプルのDNAが雄由来なのか雌由来なのかは分からない。メダカはY染色体を持ち、XYが雄、XXが雌になる。今回、Y染色体のみにコードされている雄性決定遺伝子DMYのプライマーセットでPCRし雌雄を判定する。同時に雌雄両方に存在するDNA配列を増幅する51H7Fプライマーセットも用いる。雌由来のDNAサンプルではDMYプライマーセットによる増幅が起きない。しかし、雄由来のDNAサンプルでもDNAが分解していれば、DMYは増幅されない。そこで、鋳型DNAを51H7FプライマーセットでPCRすることで、鋳型DNAが分解されていないことやPCR反応液に問題がないことなどが検証可能で、DMYプライマーによるPCRの結果が偽陰性でないことを確認できる。さらに超純水（H₂O）を鋳型にしてPCRを行うことで、DNA溶液以外の反応試薬の中にDNAが混入していないことを検討でき、PCR結果が偽陽性でないことを証明できる。

<材料>

鋳型溶液: DNA①、DNA②（雌もしくは、雄から抽出したDNA、サンプルが雄雌どちらの由来なのかを実験で調べる。）、H₂O（滅菌処理した超純水）

<試薬>

1. PCR 反応液 (KOD-FX, TOYOBO):

バッファー、dNTP、DNAポリメラーゼ

2. プライマーセット:

- プライマーセット A (DMY, 雄性決定遺伝子):

Fw 5'-GAACCACAGCTTGAAGACCCCGCTGA-3'

Rv 5'-GCATCTGCTGGTACTGCTGGTAGTTG-3'

- プライマーセット B (51H7F, X と Y 染色体に両方に存在する遺伝子):

Fw 5'-CAGGCCTTGAAGATCAACGAGT-3'

Rv 5'-AGTGCATCTAGTGTACATGGGT-3'

<器具>

1. ピペットマン (P10, P200) ※各自 1 本ずつ
2. 200 μ l チューブ ※各自 4 本
3. サインペン
4. 小型遠心機 (共同で使用)
5. サーマルサイクラー (共同で使用)

<操作>

1. 200 μ l チューブを 4 本準備する。他の人のサンプルと区別がつくように蓋と側面にマークをつけておく。※数字、文字など自由に決める。
2. 以下のようにサンプルを調整する。200 μ l チューブに、
 - 1) P10で鋳型DNAを5 μ l加える。終わったらチップを交換する。
 - 2) P10でプライマーセットを5 μ l加える。終わったらチップ廃棄する。
 - 3) P200でPCR反応液を40 μ l加える。終わったらチップを廃棄する。

サンプルの構成

サンプルNo.	1	2	3	4
鋳型DNA	DNA① or ②を 5 μ l	DNA① or ②を 5 μ l	H ₂ Oを 5 μ l	H ₂ Oを 5 μ l
プライマーセット	Aを5 μ l	Bを5 μ l	Aを5 μ l	Bを5 μ l
PCR反応液	40 μ l	40 μ l	40 μ l	40 μ l

3. 卓上小型遠心機を用いて反応液をチューブの底に落とす。
 - 卓上小型遠心機は、サーマルサイクラーの近くに設置。
 - サンプルは、チューブ立てに立てた状態で遠心機まで持ってくる。
4. 反応開始まで、氷冷
 - サーマルサイクラーの近くに氷を入れた発泡スチロールの箱を設置
 - 全員がサンプル調整を終わるまで、氷上に置いたチューブに静置すること。

5. サーマルサイクラーで、以下のような反応温度及び反応時間を設定し、PCR を行う。

94 °C 2分	
98 °C 10秒	} 35 Cycle
66 °C 30秒	
68 °C 2分	
4 °C	

6. アガロースゲル電気泳動による PCR反応のチェックを行う。

3.3 アガロースゲル電気泳動によるPCR産物のチェック

<原理>

アガロースゲル電気泳動は、DNAやRNAといった核酸をそれらの持つ電気的な性質を利用し分離する方法である。核酸は、負の電荷を持っており（図1）、電場をかけることにより、アガロースゲルの編目構造のなかをプラス極へ移動する（図2）。DNAの場合、長いDNAは、アガロースの編目構造にトラップされながら進むので遅く、短いDNAは編目構造にトラップされにくい為、早く進む。このような移動速度の違いからDNAの混合物を分離することが可能である。また既に長さの明らかになっているDNAを集めた分子量マーカーと並べて泳動することにより、自分の興味のあるDNAの長さを計算することができる。

DNAは、電気泳動により分離しても肉眼では観察できない為、通常はエチジウムブロマイド (EtBr) を使用し可視化する。EtBrは、DNAの二本鎖にはまり込む（インターカレートする）。そして、DNAとEtBr の複合体は、紫外線の照射に対して、蛍光を発するので、検出することが可能である。

今回は、EtBr と似た化学的性質をもつが、皮膚の透過性が低く、毒性の少ない安全な試薬、GelRed を用いる。

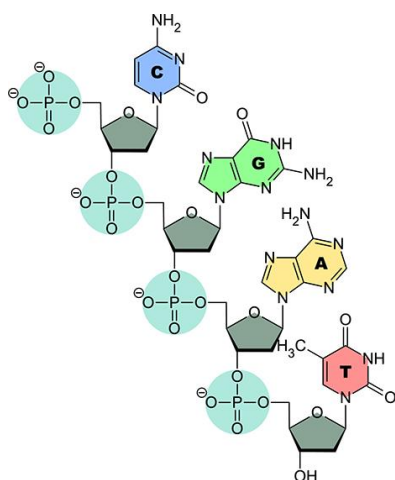


図1. DNAの分子構造

緑色の丸で囲んだリン酸基が負の電荷を持つ

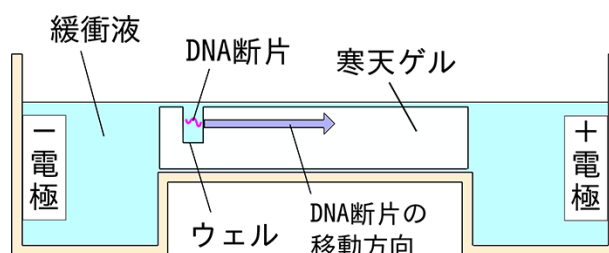


図2. DNAが泳動する仕組み

参考

図 1. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA-Nucleobases.svg>

By Sponk, Public domain

図 2.

https://ja.m.wikibooks.org/wiki/%E3%83%95%E3%82%A1%E3%82%A4%E3%83%A%E3%82%A2%E3%82%AC%E3%83%AD%E3%83%BC%E3%82%B9%E9%9B%BB%E6%B0%97%E6%B3%B3%E5%8B%95%E6%B3%95_%E5%8E%9F%E7%90%86%E5%9B%B3.svg By すじにくシチュー, Creative Commons CC0 1.0 Universal

Public Domain Dedication

注意点：ゲルは、比較的安全な GelRed 試薬が使用されているが、作業時は、手袋をして素手で触らないようにすること。

<試薬>

ローディングダイ（6倍濃度溶液で、グリセロール、ブロモフェニルブルー色素、キシレンシアノール色素を含有）、分子量マーカー(Gene Ladder 100, ニッポンジーン) (図1)、アガロースゲル（1.5%ゲル、アガロースME中等度電気浸透度品, 和光）、泳動用バッファー（TAE buffer）

<器具等>

ピペットマン（P20, P10）、チップ、パラフィルム、電気泳動装置、トランスイルミネーター

<操作>

1. ゲルを電気泳動装置にセットする。



● 2名で1つの泳動槽を使用

● 1名で1枚のゲルを使用

● 一番左のレーンが分子量マーカー

● 分子量マーカーの隣がPCRサンプル

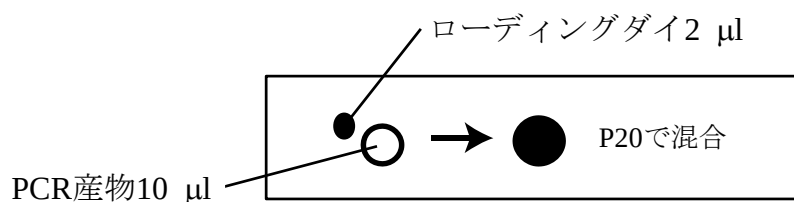
分子量マーカー、DNA①or②プライマーA, DNA①or②プライマーB, H₂OプライマーA, H₂OプライマーBという配置をお勧めします。）

● 1名が終了したら次の1名がアプライする。

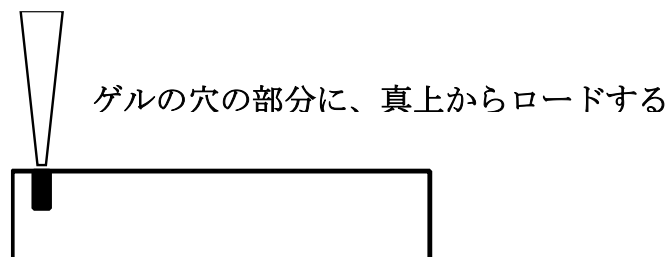
2. パラフィルムを準備する。

3. P10を使いパラフィルムの上に、ローディングダイを2μl のせる。

4. P20を使いPCR産物を10μl とり、パラフィルム上の泳動バッファーと混合する。



5. P20をそのまま使い、パラフィルム上で混合した「ローディングダイ+ PCR産物」を、ゲルにロードする。



6. 分子量マーカー 5 μ l ※をゲルにロードする。

※ローディングダイは既に含まれているので、新たに加えずに良い。

7. およそ30分間泳動する。

8. トランスイルミネーターで確認する。

9. スマホで写真を撮影する。

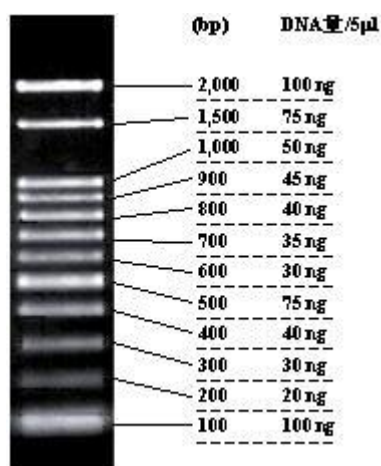


図1. Gene Ladder 100 のバンドパターン

<https://www.nippongene.com/siyaku/product/electrophoresis/ladder-dna/gene-ladder.html>

参考資料 ピペットマンの操作方法

ピペットマンとは

ピペットマン（GILSON社商標、一般名称マイクロピペット）は微量な液体を操作するための器具であり、任意の容量を吸引・吐出できる。また使い捨てのチップを使用することで試料間の汚染を防ぐことができる。生物学・分子生物学・生化学の実験では頻繁に使用するため操作を習熟しておくといよい。

ピペットマンの構造

ピペットマンの構造を図1に示す。図上部にあるプッシュボタンで吸引・吐出操作を行う。またこのボタンで容量設定もできる（後述）。溶液の操作は必ずチップをピペットマン先端に取り付けた状態で行う。溶液はチップの内部でのみ接触する。イジェクターボタンを押すことによってチップを片手で取り外すことができる。



図1 ピペットマンの構造

容量のセット

容量目盛りは、3つの数字からなり、上から下へ読む。GILSON社のピペットマンの目盛りの例を図2に示した。容量のセットはプッシュボタンまたはモーションナット（サムホールにあるダイヤル）を目的の容量になるまで回す（図2）。また目的の容量により最適なモデルを選択する（表1）。容量設定時に容量可変範囲を超えてダイヤルを回すことは本体の破損を招くため絶対に行ってはならない。

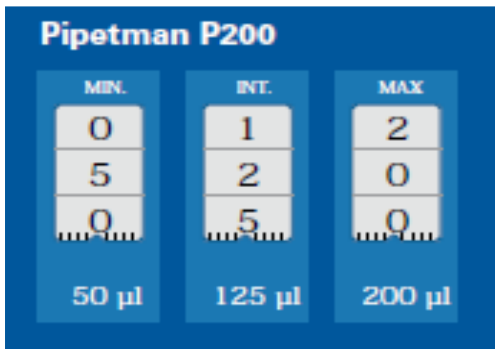


図2 容量表示のよみとり

表1 各モデルの容量可変範囲

model	volume range
P2 / U2	0.2 - 2 µl*
P10 / U10	1 - 10 µl*
P20 / U20	2 - 20 µl
P100 / U100	20 - 100 µl
P200 / U200	50 - 200 µl* / 20 - 200 µl
P1000 / U1000	200 - 1000 µl
P5000 / U5000	1 - 5 ml
P10ml / U10ml	1 - 10 ml

吸引、吐出操作

1. チップ立て（ラック）にささった状態のチップにピペットマンを差し込み固定する。
2. プッシュボタンを第一ストップまで押しこむ（図3A）。
3. ピペットマンを垂直に持ち、そのままの状態溶液に浸す。チップを溶液にあまり深く差し込み過ぎるとコンタミネーションの可能性が増すとともに、水圧の影響で正確な量を吸引できなくなる。
4. プッシュボタンをゆっくり戻し、溶液を吸引する（図3B）。
5. チップを静かに引き上げる。チップに溶液が付着している場合、容器の内壁にチップの先端を軽く押し当て、よく溶液を切る。チップ内に溶液が入っている場合は、ピペットマンを横にしない。
6. 溶液を入れる容器の内壁にチップの先を軽くあて、プッシュボタンを第1ストップまで押しこんで、溶液を出す（図3C）。
7. プッシュボタンを第2ストップまで押しこんで、チップ内の溶液を完全に吐出する（図3D）。
8. プッシュボタンを押したままの状態
で、チップを容器から離す。
9. プッシュボタンを戻す（図3E）。

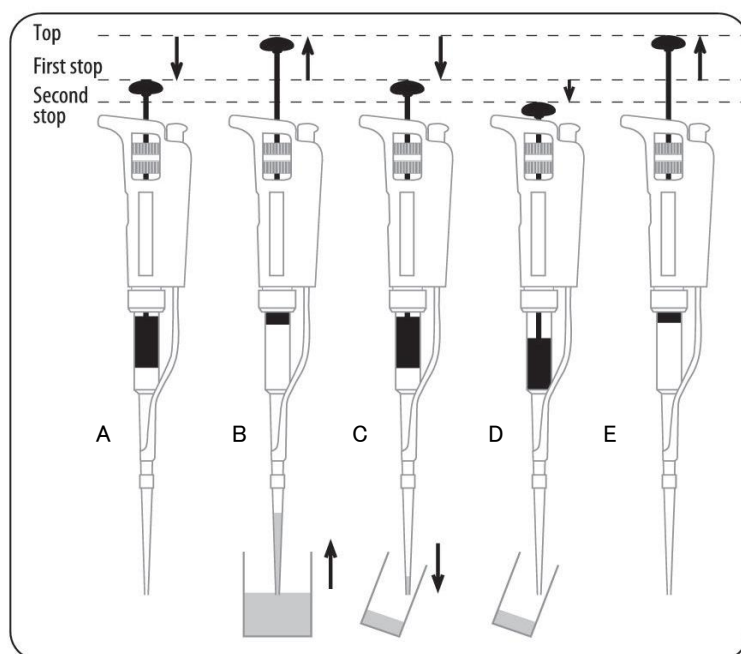


図3 ピペットマンの操作