

平成18年度文部科学省SPP

プロテオーム解析を用いて 抗原抗体反応の特異性を見る

東 俊太朗

林 寿樹

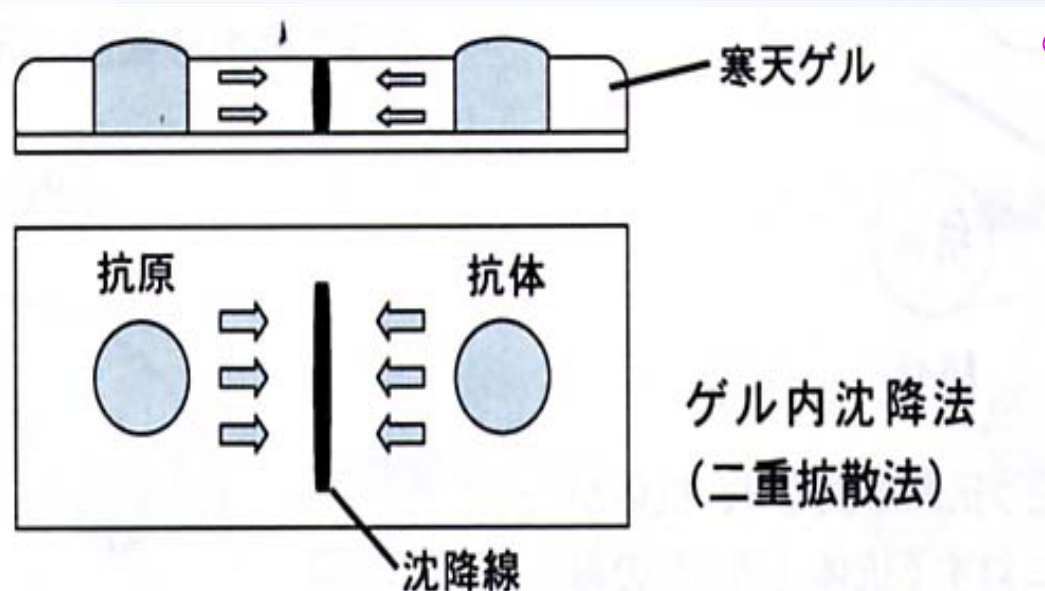
牛村 英里

八十川 竜太

高波 綾乃

オクタロニー法による免疫沈降

♪ 一晩置く ♪

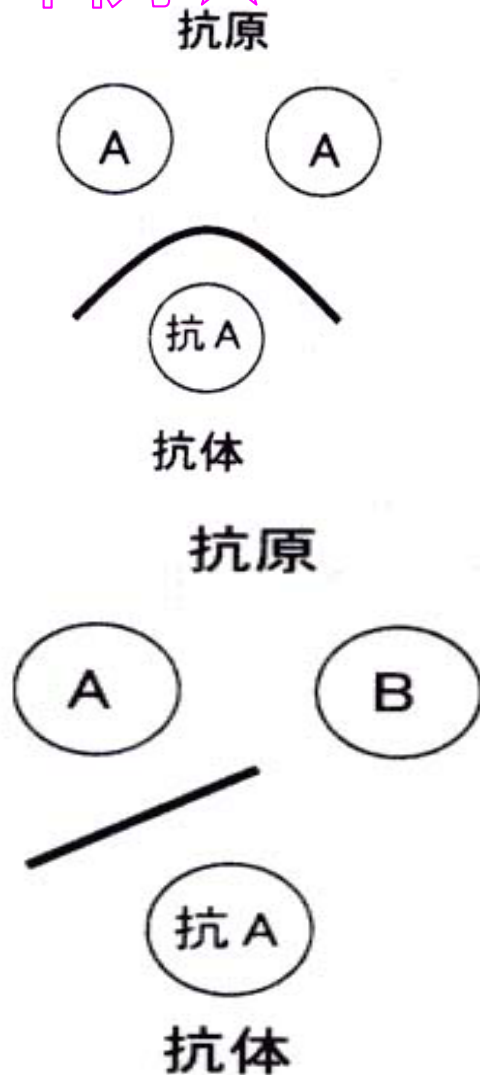


抗ヒトヘモグロビン抗体

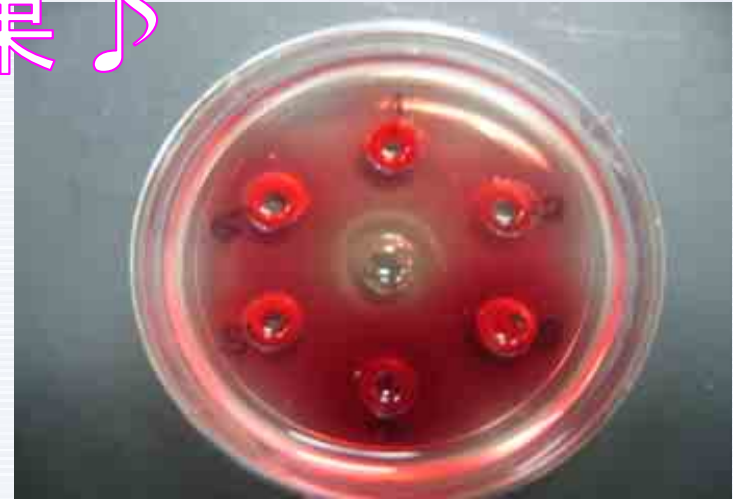
ゲル内で可溶性抗原に抗体を反応させて、沈降反応による沈降物を観察し、抗原や抗体の純度、含まれる抗原抗体反応の数を知る

オクタロニー二重免疫拡散法

☆沈降例☆



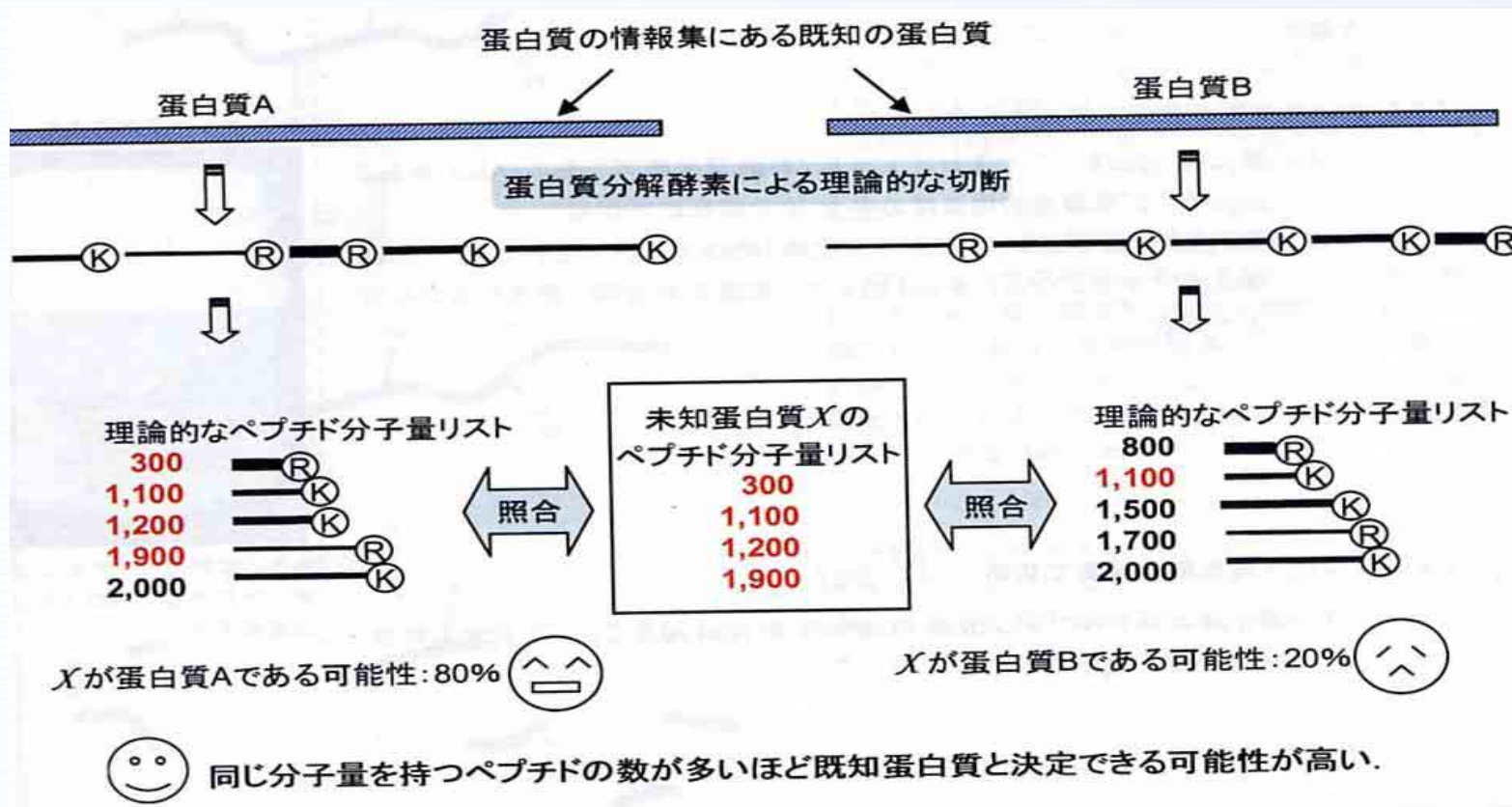
♪結果♪



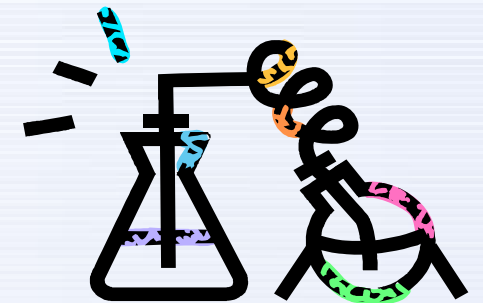
抗体がその抗原に対する
抗体を含む時沈降線が沈む
沈降例の通りになった

◇質量分析法によるタンパク質の同定◇

蛋白質の情報集の中の全ての既知の蛋白質について、
それぞれ理論的なペプチド分子量リストをコンピュータ上で作製し、
実測した分子量リストと照合させる。



タンパク質は
両端を引っ張ると
アミノ酸が連なった、
1本のひもになる。



◇オクタロニーの免疫沈降線に含まれるタンパク質の解析◇

沈降線の取り出し

* 周りの余分なゲルを
入れないように！！

タンパク質の還元・アルキル化

* 遮光させながら反応させる。

タンパク質を消化酵素で切断

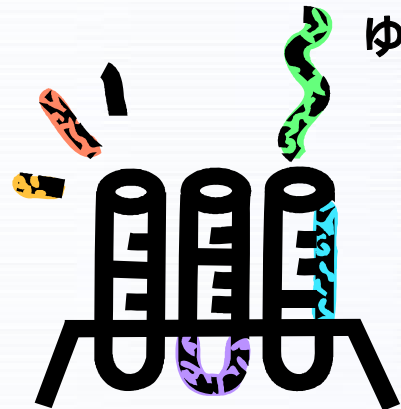
* 恒温槽の中で一晩反応。

サンプル溶液の粗精製

* 卓上遠心機での遠心。

ペプチド溶液の精製

* Zip Tip樹脂にしっかり吸着するように
ゆっくりピペティング。



アルキル化反応の遮光



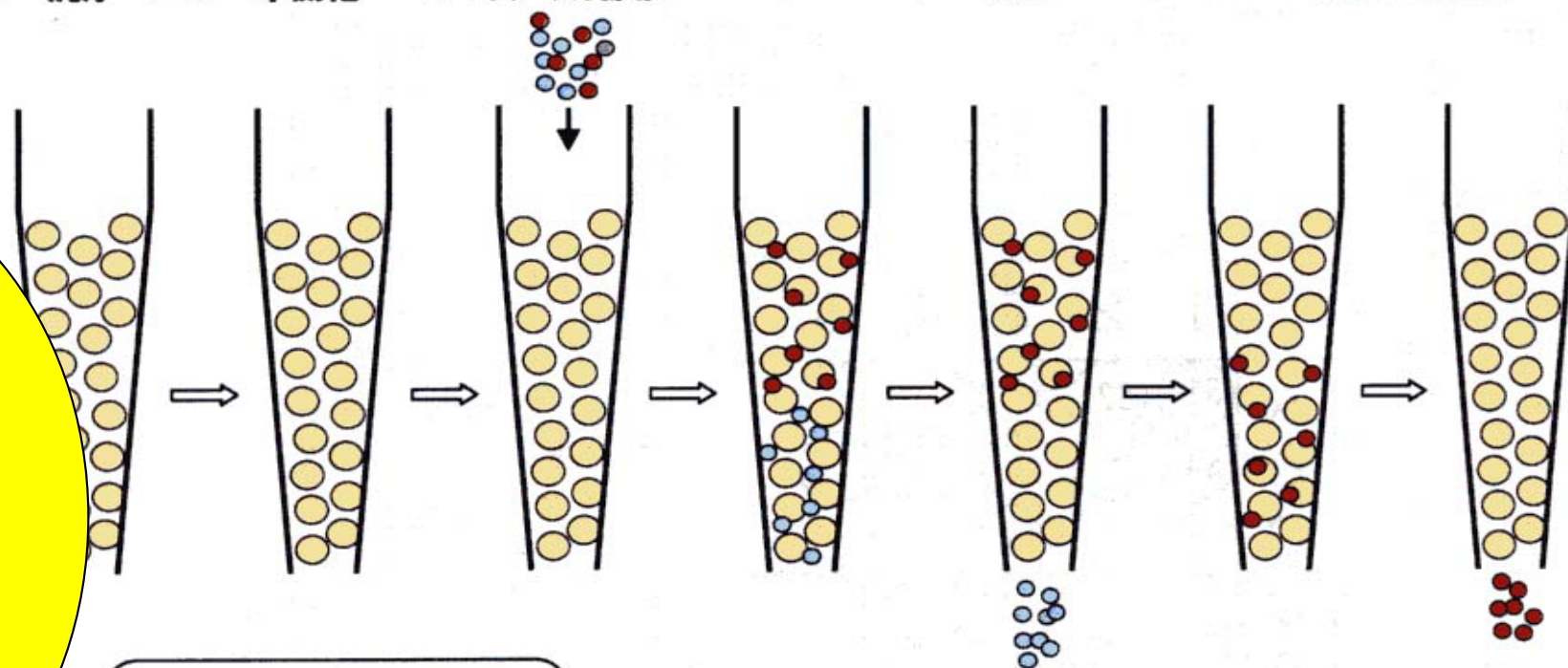
サンプル溶液作製中

◇Zip Tipによるペプチド溶液の精製◇

ZipTip による精製のしくみ



洗浄 ⇒ 平衡化 ⇒ サンプル添加 ⇒ ⇒ 洗浄 ⇒ ペプチドの溶出



注意事項

樹脂の中に
泡が入る事。

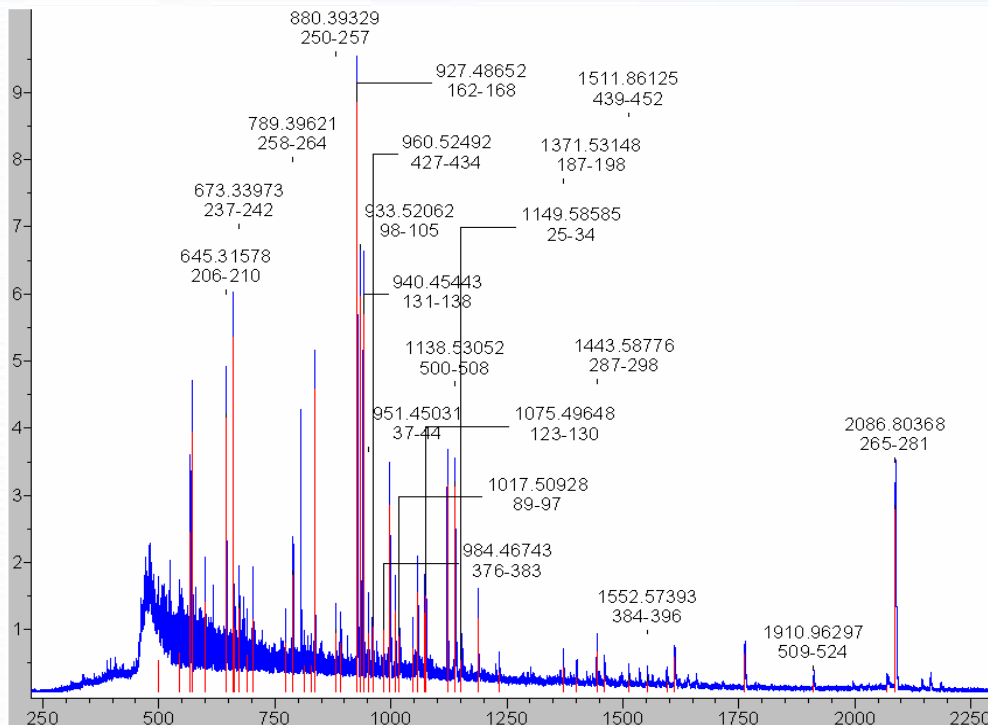
吸い上げ過ぎ、
吐き出し過ぎ。



- 固定相 (疎水性担体)
- ペプチド
- 塩類など

☆質量分析装置による解析と結果☆

下のグラフは、これまで実験してきたタンパク質をレーザーで質量別に分けた図です。縦軸が一種類のアミノ酸の量で、横軸がアミノ酸の種類を示しています。よってこれは、同じ質量のアミノ酸がどれだけあるかを表していて、このグラフによってアミノ酸の主な種類を区別できます。

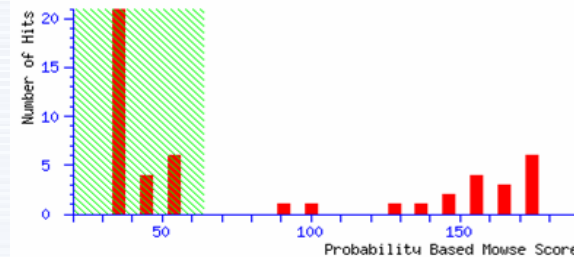


MATRIX SCIENCE Mascot Search Results

User :
Email : ytanaka@fmsrsa.fukui-med.ac.jp
Search title :
Database : NCBI nr 20060729 (3822560 sequences; 1317468070 residues)
Taxonomy : Homo sapiens (human) (148861 sequences)
Timestamp : 4 Aug 2006 at 06:07:48 GMT
Top Score : 174 for gi|55669910, Chain A, Crystal Structure Of The Ga Module

Probability Based Mowse Score

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 64 are significant ($p < 0.05$).



上のグラフは、タンパク質の種類を同定するためのソフトによって求められたものです。斜線部外のグラフの値が大きいほどより正確に結果がでたことになります。

六人で、アミラーゼ・アルブミン・ヘモグロビンをそれぞれ同定しましたが、ヘモグロビンは上手く結果が出ませんでした。アルブミンは、正確に同定できました。

* 感想 *

・牛村 英里

慣れない実験器具を使いながらの実験でしたが、講師の方々の手厚いご指導により、しっかりひとつひとつの事を理解する事が出来、更に実験、化学への関心が深まりました。

・高波 綾乃

今回の実験を通して免疫の仕組みを肌で実感する事ができました。楽しく実験を行えたので、参加して本当に良かったと思いました。医療関係への進学を希望しているので、これからの勉強に役立てたいと思います。

・八十川 竜太

学校ではあまり実験をしないし、実験内容を読む限りでは出来るか心配だったけど、やってみると意外に理解でき、とても楽しく実験することができました。このことをいかしていろいろな実験に挑戦したいと思います。

* 感想 *

◻ 東 俊太朗

難しそうな実験でしたが、わかり易い説明のお陰でやり易かったです。この実験を通して生物学への興味が、より一層深まりました。遠心分離機やマイクロピペット等、学校の授業では触れることの出来ない実験器具に触れてうれしかったです。

◻ 林 寿樹

普段では出来ないこのような本格的な実験を通して、学校の生物の授業では習えない貴重な体験をすることが出来ました。新聞やテレビなどで多少は聞いたことのある実験ではありましたが、頭でなんとなくでしか捕らえてなかった事柄も、この様に実験を通す事でより確実になりました。この実験を指導していただいた講師の方々、本当に有難う御座いました。