



II.電気泳動法



【電気泳動法の原理、等電点電気泳動法】

問1 電気泳動において、イオン性物質の移動速度と比例するのはどれか。1つ選べ。(97 回問 4)

- 1 イオン性物質の半径 2 イオン性物質の電荷 3 溶液の粘度
- 4 溶液の pH 5 電極間の距離

問2 電気泳動法に関する記述のうち、誤っているのはどれか。2つ選べ。

(88 回問 29、94 回問 28、99 回問 98)

- 1 イオンの泳動速度は、温度に依存しない。
- 2 分子量の小さい薬物や生体成分の分離には使用できない。
- 3 pH2 の緩衝液中では、アラニンは陰極に泳動される。
- 4 等電点電気泳動では、電極間に pH 勾配を形成させてタンパク質の分離を行う。
- 5 等電点電気泳動では、物質の分子量は分離にほとんど影響しない。

【アガロースゲル電気泳動法、SDS-PAGE】

問1 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った後、タンパク質の染色に用いる最も適切な化合物はどれか。1つ選べ。(109 回問 5)

- 1 ニンヒドリン
- 2 臭化エチジウム
- 3 *o*-フタルアルデヒド
- 4 フルオレセインイソチオシアネート
- 5 クーマシーブリリアントブルー (クマシーブリリアントブルー)

問2 電気泳動法に関する記述のうち、正しいのはどれか。2つ選べ。

(89 回問 29、95 回問 28、99 回問 98)

- 1 アガロースゲル電気泳動で DNA が分子サイズによって分離できるのは、DNA ごとに単位電荷当りの質量が同じためである。
- 2 アガロースゲル電気泳動で DNA を分離するには、試料に臭化エチジウムを加える必要がある。
- 3 タンパク質の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、タンパク質はその塩基性残基の数に等しい SDS 分子がイオン結合した状態で泳動される。
- 4 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、タンパク質は陽極から陰極に向かって泳動される。
- 5 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、ゲルの濃度が高いほど、タンパク質の移動度が小さくなる。

問3 マウスのある組織から目的のタンパク質を精製し、その性質を明らかにするため、以下の2つの実験を行った。実験方法と考察に関する記述のうち、正しいのはどれか。2つ選べ。(100回問115)

【実験1】 精製したタンパク質のジスルフィド結合を還元後、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) -ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ゲル中のタンパク質を染色すると、単一のバンドが観察された。分子量が既知の5種類の標準タンパク質についても同様の操作を行い、図1の結果を得た。

図1

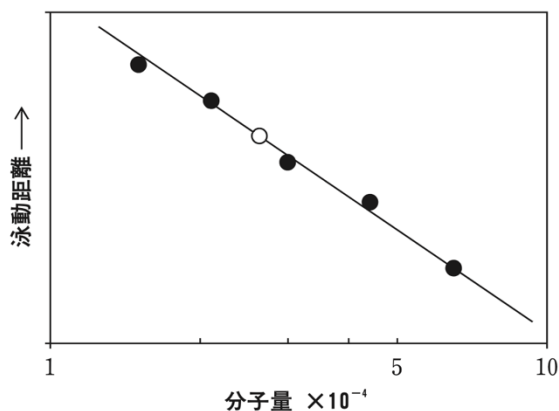


図1 5種類の標準タンパク質 (●) と精製タンパク質 (○) の電気泳動での移動距離 (泳動距離) と分子量との関係

【実験2】 精製したタンパク質を用いてゲルろ過クロマトグラフィーを行った。分子量が既知の6種類の標準タンパク質についても同様の操作を行い、図2の結果を得た。

図2

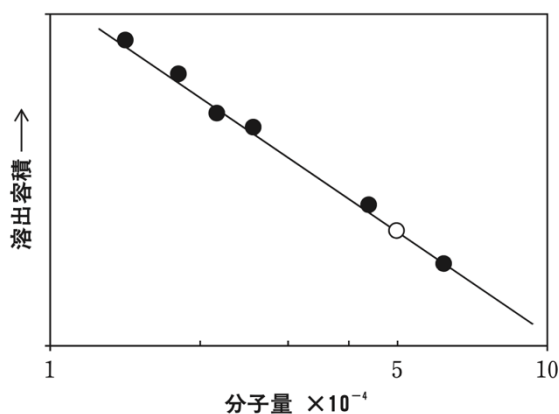


図2 6種類の標準タンパク質 (●) と精製タンパク質 (○) の溶出容積と分子量との関係

- 1 【実験 1】では、電気泳動の前に、試料に SDS と 2-メルカプトエタノール (2-ME) を含む緩衝液を加えて加熱した。
- 2 【実験 1】のタンパク質の染色には、臭化エチジウム (ethidium bromide) を用いた。
- 3 【実験 2】では、カラムから溶出したタンパク質を検出するため、溶出液の 260 nm における吸光度を連続的に測定した。
- 4 【実験 1】の結果より、精製したタンパク質の単量体 (モノマー) の分子量は、およそ 25,000 Da と考えられる。
- 5 【実験 1】及び【実験 2】の結果より、精製したタンパク質は 4 量体 (テトラマー) として存在すると考えられる。

問4 タンパク質 X を含む細胞抽出液 (試料ア) をドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 及びサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により分析した。SDS-PAGE に際し、試料アに SDS と 2-メルカプトエタノールを添加して前処理した (試料イ)。図 1 のレーン A は分子量が 25 kDa、35 kDa、40 kDa、55 kDa の 4 種の分子量マーカータンパク質を示し、レーン B は試料イを分離したときの泳動結果である。図 2 は精製したタンパク質 X 溶液 (試料ウ) と上記の 4 種の分子量マーカータンパク質を混合して分離したときのクロマトグラムである。以下の記述のうち、正しいのはどれか。2 つ選べ。(103 回問 119)

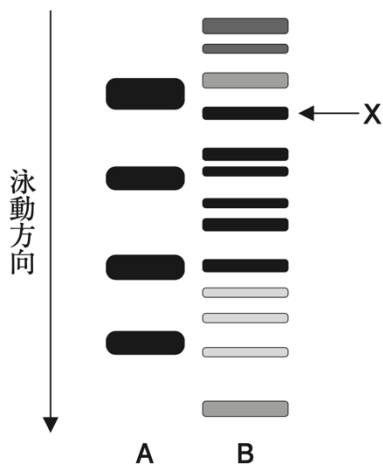


図 1

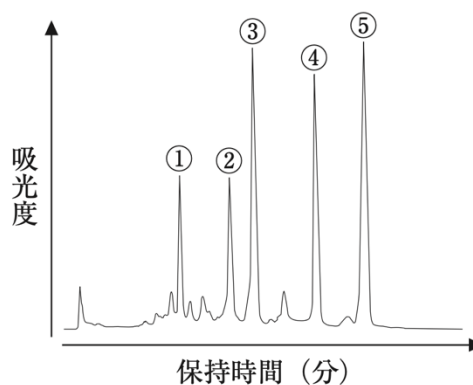
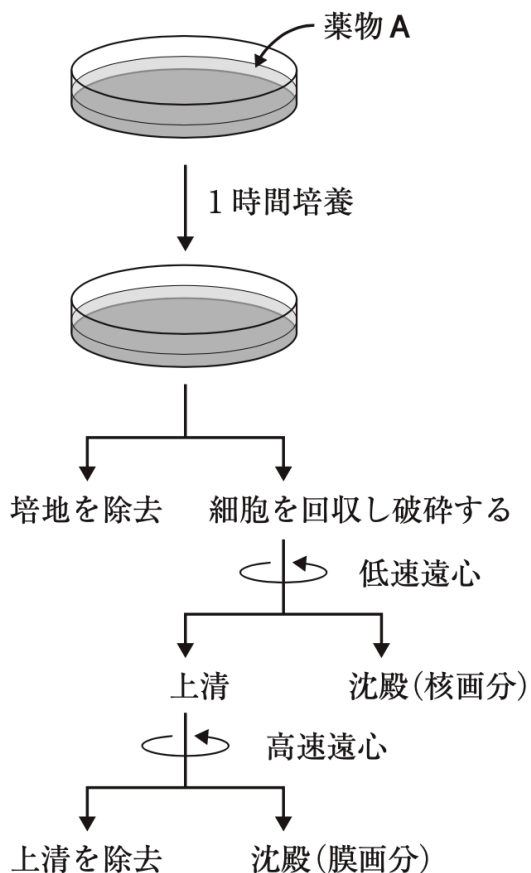


図 2

- 1 SDS-PAGE では、試料イのようにタンパク質を SDS と 2-メルカプトエタノールで酸化的に前処理することで分子量に基づいた分離が可能になる。
- 2 SDS-PAGE において、タンパク質は陰極から陽極に向かって移動する。
- 3 タンパク質 X の分子量は、40 kDa から 55 kDa の間である。
- 4 SEC の固定相として、プロテイン A 固定化シリカゲルが用いられる。
- 5 SEC によりタンパク質 X が単量体として溶出されるとき、そのピークは④である。

問5 薬物 A に感受性のある培養細胞を用いて、その細胞内の代謝調節タンパク質 B について調べることにした。

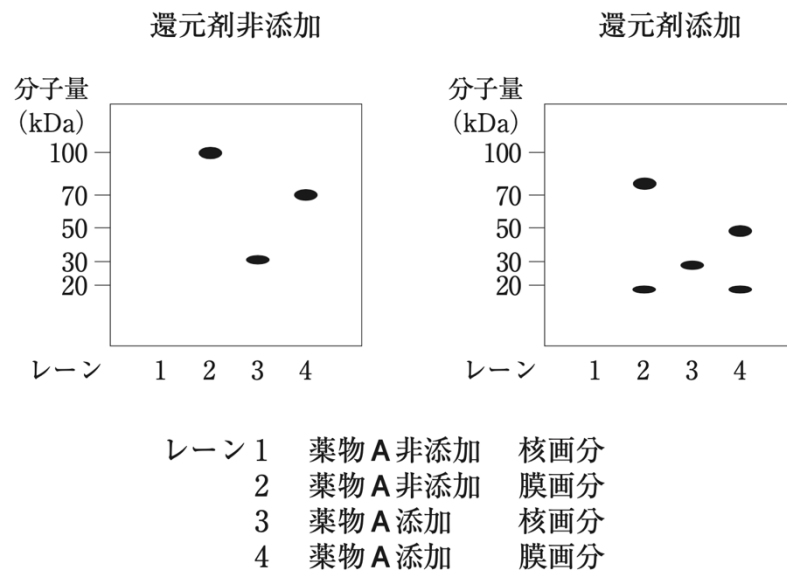
図 1



操作の流れを図 1 に示す。培地に薬物 A を添加して細胞を 1 時間培養した後、培地を除去してから細胞を回収した。細胞を破碎し、低速度の遠心操作で核画分を分離回収した。さらに高速度の遠心操作で、核を除いた細胞の膜画分を分離回収した。また、対照として、培地に薬物 A を添加しなかった細胞についても同様の操作を行った。

ドデシル硫酸ナトリウムを用いたポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) にて、核画分及び膜画分中のタンパク質を分離し、タンパク質 B に対するポリクローナル抗体を用いてウェスタンブロットを行った。SDS-PAGE は、還元剤 (2-メルカプトエタノール) を添加した条件と添加しない条件の 2 通りの方法で行ったところ、図 2 に示す結果を得た

図 2



以上の実験結果とその結果から推測される記述のうち、正しいのはどれか。2つ選べ。

(107 回問 114)

- 1 タンパク質 B は、核膜に局在するタンパク質である。
- 2 タンパク質 B は、分子間ジスルフィド結合を持つ。
- 3 タンパク質 B から生じた約 30 kDa のタンパク質は、核内に移行する。
- 4 タンパク質 B は、薬物 A で刺激された細胞内で 3 つに切断される。
- 5 タンパク質 B の分子量は、約 50 kDa である。

問6 タンパク質Xは、細胞質内ではサブユニットA(分子量60,000)とサブユニットB(分子量30,000)がそれぞれ1つずつ非共有結合で会合したヘテロ二量体を形成している。タンパク質Xは、増殖因子Fの刺激によりサブユニットAのみチロシン残基がリン酸化され、サブユニットBと解離する。培養細胞を用いて以下の実験を行った。予想される結果として正しいのはどれか。1つ選べ。

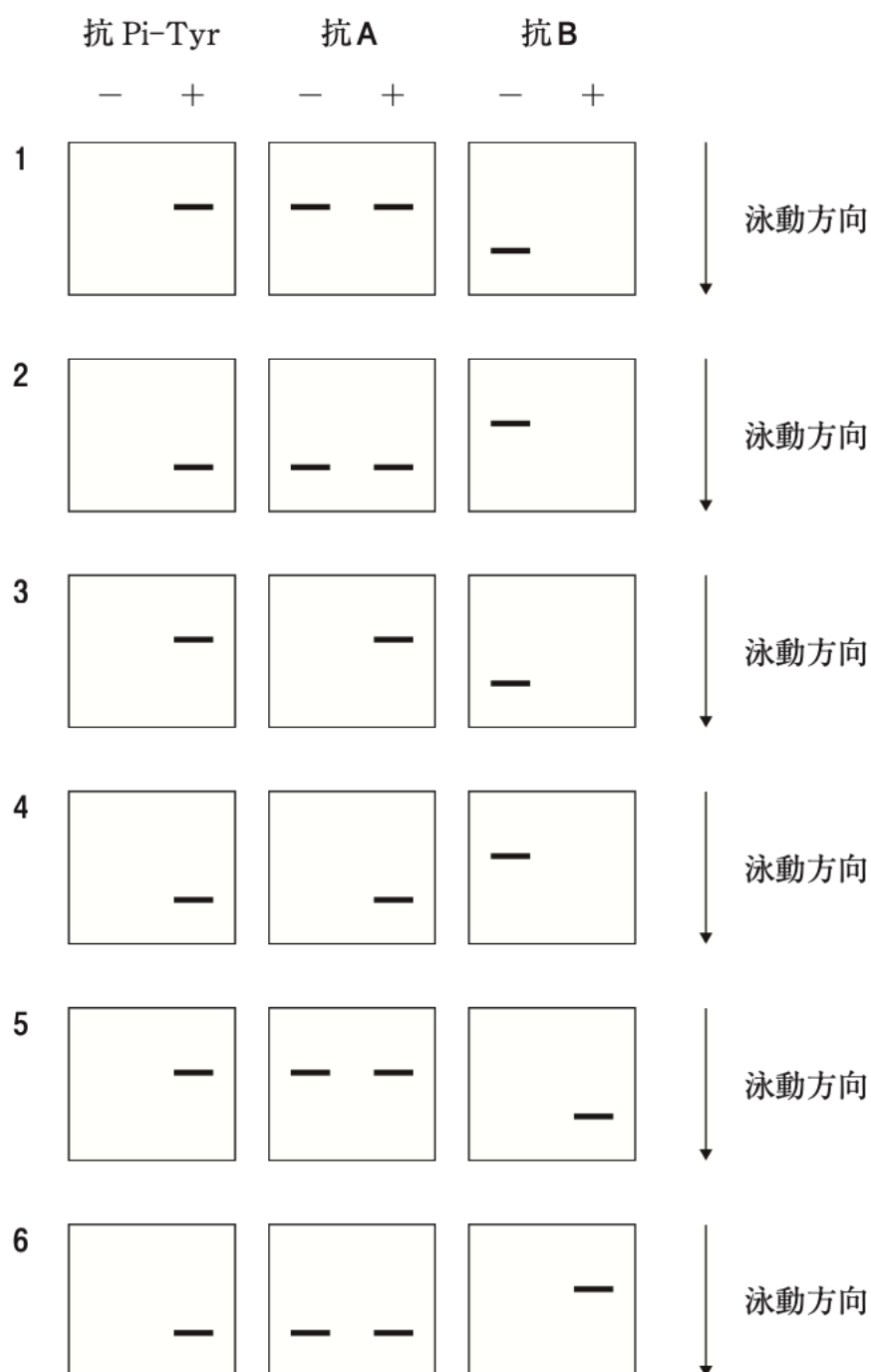
(105 回問 116)

- ① Fでこの細胞を刺激した。同時に未刺激の細胞も用意した。
- ② それぞれの細胞を破碎して細胞抽出液を得た。
- ③ 各細胞抽出液に、サブユニットAに対する抗体(抗A)を添加して免疫沈降^(注1)を行った。
- ④ 沈降物を三等分し、それぞれをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。
- ⑤ 分離したタンパク質をニトロセルロース膜に電氣的に転写し、抗リン酸化チロシン抗体(抗Pi-Tyr)^(注2)、抗A、サブユニットBに対する抗体(抗B)をそれぞれ用いたウエスタンブロット法を行った。

ただし、Fによる刺激で、A、B両サブユニットの発現量に変化はなく、分解も起こらないこと、また、チロシン残基がリン酸化されても、電気泳動移動度、抗Aによる免疫沈降及びウエスタンブロット法における認識には変化がないことを確認している。

注1：抗体を添加後、生じた免疫複合体を不溶性担体に吸着させて遠心分離によって回収する方法。

注2：タンパク質中のリン酸化されたチロシン残基を特異的に認識する抗体。



+ : 増殖因子 F により刺激した細胞からの抽出液
 - : 未刺激の細胞からの抽出液

【二次元電気泳動法】

問 1 二次元電気泳動は、等電点電気泳動と SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を組み合わせたもので、ある生体試料中の多種多様なタンパク質をそれぞれ固有の等電点と分子量の違いを利用して分離する方法である。図 1 と図 2 は、二次元電気泳動の概要と実験結果を示したものである。

図 1 等電点電気泳動 : pH4~10 の連続的な pH 勾配を形成させた棒状のゲルを準備する。このゲルを用いて電気泳動すると、試料中の各タンパク質はそれぞれの等電点の位置までゲル中を移動する。

(注 : 実際にはこの段階ではゲルは染色しないためタンパク質は見えないが、図 1 の下段では電気泳動後にタンパク質が等電点で分離しているイメージを示した。)

図 1

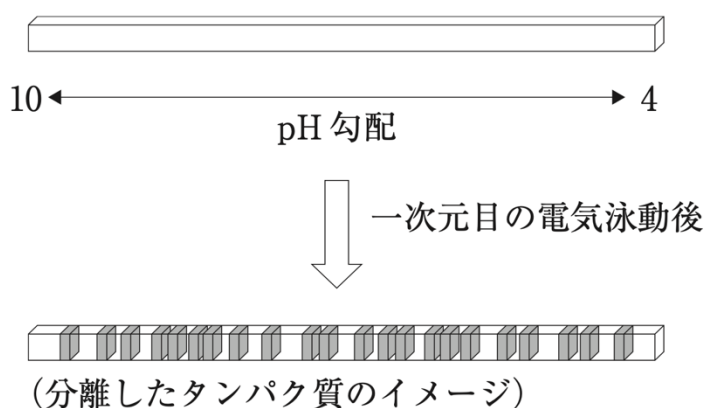
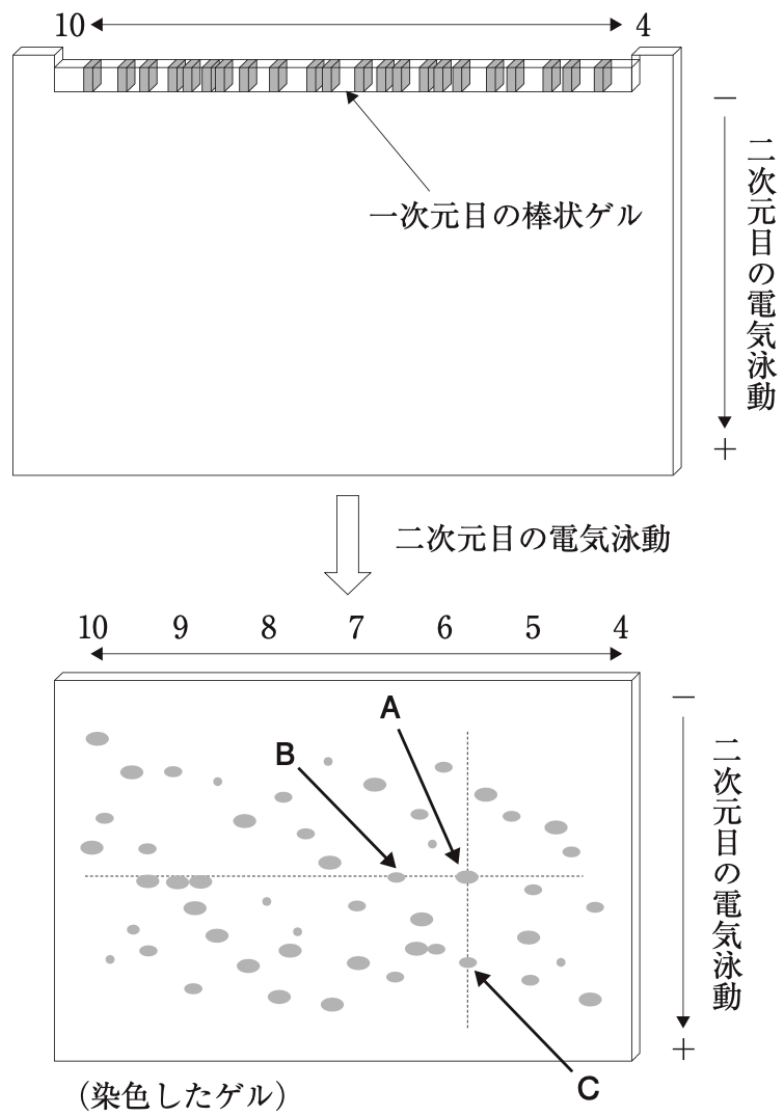


図 2 SDS-PAGE : 等電点電気泳動により試料中のタンパク質を分離した棒状ゲルを、SDS-PAGE の分離ゲルの上に移し、一次元目の等電点電気泳動と直角の方向に電気泳動する。タンパク質は、その分子量に応じた位置まで移動する。

電気泳動の終了後、泳動用のガラス板から取り出したゲルを洗浄し、クマシーブリリアントブルーでタンパク質を染色したところ、50 個のスポットを検出した。図 2 中のスポット A は、等電点 5.8、分子量 56,000 のタンパク質である。

図 2



このようなタンパク質分析法とその実験結果に関する記述のうち、誤っているのはどれか。1つ選べ。(108回問 114)

- 1 等電点が 5.8 より小さく、かつ分子量が 56,000 より大きいスポットは、4つ検出されている。
- 2 スポット A のタンパク質では、中性溶液中での分子全体の電荷が負になる。
- 3 スポット B のタンパク質の等電点は、ほぼ 5.8 である。
- 4 スポット C のタンパク質は、分子量 56,000 より小さい。
- 5 タンパク質のスポットの位置は、リン酸化により、やや右上方向に移動すると推測される。

【キャピラリー電気泳動法】

問1 フューズドシリカを用いたキャピラリー電気泳動法 (CE) に関する記述のうち、正しいのはどれか。

2つ選べ。(89 回問 29、96 回問 28、100 回問 98)

- 1 中性の電解質溶液を満たしたフューズドシリカ製キャピラリーの内壁は、シラノール基の解離により負電荷を帯びる。
- 2 pH3 以下の酸性溶液中では、陰極から陽極に向かう電気浸透流が発生する。
- 3 電気浸透流はキャピラリー電気泳動に特有のものであり、ろ紙電気泳動では発生しない。
- 4 液体クロマトグラフィーと比較して、CE で試料の拡散が少ないのは、電気浸透流が栓流であるためである。

問2 電気泳動法に関する記述のうち、正しいのはどれか。 2つ選べ。(96 回問 28、100 回問 98)

- 1 フューズドシリカ製キャピラリーと中性の緩衝液を用いて電気泳動を行うと、陰イオン性物質は中性物質よりも速く泳動される。
- 2 キャピラリーゾーン電気泳動では、泳動液の pH が高いほど、中性試料成分の泳動速度が遅くなる。
- 3 ミセル動電クロマトグラフィーでは、泳動液にイオン性界面活性剤を添加することで、中性物質の分離が達成される。
- 4 キャピラリーゲル電気泳動で DNA を分離すると、サイズの小さなものから順に検出される。
- 5 キャピラリーゲル電気泳動法は、ペプチドのアミノ酸配列決定に広く用いられている。

問3 キャピラリー電気泳動は、微量の試料の分析に極めて有用であり、臨床検査における血清タンパク質の分析にも用いられている。溶融シリカ毛細管を用いたキャピラリー電気泳動に関する記述のうち、正しいのはどれか。 2つ選べ。(107 回問 100)

- 1 pH7 の緩衝液を用いると、電気浸透流は陰極から陽極の方向に向かう。
- 2 キャピラリーゾーン電気泳動では pH7 の緩衝液を用いると、陽イオン性物質と中性物質は同時に泳動される。
- 3 キャピラリーゲル電気泳動でタンパク質を分離すると、分子サイズの大きい順に検出される。
- 4 キャピラリー等電点電気泳動では、緩衝液に両性電解質（ポリアミノカルボン酸など）を溶解して分離を行う。
- 5 ミセル動電クロマトグラフィーでは、中性物質の相互分離が可能である。