

カラムクロマトグラフィーによる生体高分子の分画（担当：佐藤高）

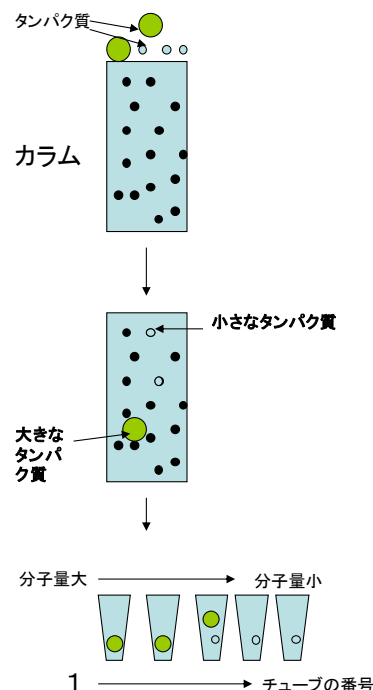
目的

サイズ排除カラムクロマトグラフィーを行い、分子量の異なる分子がカラムで分離されていく様子を観察することで、この方法の原理を理解する。

実験の原理

クロマトグラフィーは生体分子をはじめとしていろいろな分子を単離・精製するために広く使われている方法である。サイズ排除カラムクロマトグラフィーでは、小さな穴のあいた細かなビーズがカラムに充填されている。分子の混合溶液をカラムに加え、バッファー*で溶出すると、大きな分子はビーズのまわりをすり抜けてカラムを速やかに通過するのに対し、小さな分子はビーズにある穴にトラップされてゆっくりと溶出されてくる。すなわち、分子のサイズに基づいた分離を行うことができる。

*注：バッファーとは緩衝液のことで、pH が一定に保たれた溶液のことである。



実験手順

この実験は4人で1班を作り、班ごとに行う。

1. 12本のコレクションチューブを準備し、10本には「1～10」の番号を、残りの2本には「廃液」および「カラムバッファー」の表示をする。
2. ピペットを用いて4mlのカラムバッファーを「カラムバッファー」と表示されたチューブに移す。
3. カラムの上部キャップと末端のつまみを取り外す。カラムを廃液用のチューブへ立て、中のバッファーがチューブへ流れ出るのを待つ。
4. カラムをチューブ1に立てる。
5. タンパク質混合液を、ピペットマンを用いて50 μ l取り、カラムに静かに加える。
6. タンパク質混合液がカラムの中に入ったら、すぐにカラムに250 μ lのカラムバッファーを加える。チューブ1に、カラムから溶出してきた溶液を採取する。さらに250 μ lのカラムバッファーを加え、溶出してきた溶液を採取する。
7. カラムをチューブ2に立て、3mlのカラムバッファーを加える。溶液が5滴溶出してきたところで、カラムをチューブ3に立てる。
8. 以下、同様に5滴ずつ溶液をチューブ9まで採取する。この時にカラムの中でのタンパク質の移動の様子をよく観察しておくこと。

9. チューブ 10 では 10 滴を採取する。
10. おのおののチューブの色を観察・記録し、どのチューブに各々のタンパク質が溶出されたのかを考察する。

【まとめ】

- ・レポートには、目的、原理、方法、結果、考察、参考文献、課題を記載する(授業中に指示する)。
 - ・原理は、用いた試料について調べて記載する。また、カラムクロマトグラフィーの種類と原理、特にゲルろ過クロマトグラフィーによる分離の原理を調べて書く。
 - ・結果は、①カラム内での分離の様子、 ②各試験管の色の観察結果 を含める。
(いずれも図や写真のみではなく、説明を加える)
 - ・考察は、各試験管に含まれる成分の同定とその根拠について述べる。
- ・レポートは各自作成し、次回授業開始前までに提出。他人の写しは、未提出扱い(0 点)とする。