

学生実習におけるカラム更新時の試行について

阿部 まゆみ、大里 和美

筑波大学医学医療系技術室 教育部門 医学類実習担当

〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

学生実習を新たに構築するには、狙い通りの結果が出るか、実習時間内に収まるかを確認するため、事前に何度も実験を繰り返し、綿密な準備を行う。使用する機器の更新の際にも、同様の確認作業が必要である。機種を選定のためにデモ機を借りたり、最小単位で購入したりして予備実習を行い、その後の実習に必要な数を揃えるのが理想である。

しかし、1990年から使っているカラムの更新の際は、ほぼ同等品(後継品)であったため、全く確認することなく購入してしまった。

購入は2012年度のことであったが、翌年の実習前の予備実験において、学生実習には不適切だという事がわかり、いずれは使うことになるとはいえ、当面の間使用を見合わせるという事になった。

今年度、学生数が増えたこともあり、デモ用としてそのカラムを使わらざるを得なくなった。その際に、思いがけず不具合の解決の糸口が掴めたので、その経緯を報告する。

キーワード:学生実習、カラムクロマトグラフィー、ゲル濾過

1. はじめに

医学類の1年次の医学の基礎コース・分子細胞生物学で行なわれている実習に、カラム濾過によるタンパク質の分離がある。

この実習は1980年から始まり、今に至っている。

ゲル濾過法とは、ゲルを詰めたカラムで分子量の違いにより物質を分離する方法である。

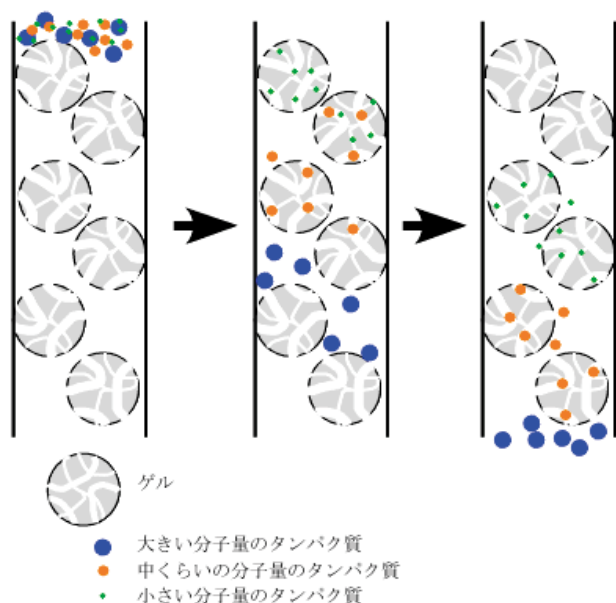


図 1. ゲル濾過の概略図

多糖類の一種デキストランを架橋して、三次元の網目構造を持った小粒子(商品名 Sephadex)を膨潤させたものをカラムに詰めて用いる。大きい分子程早く、分子が小さくなるにつれ遅く溶出する。なぜならば、中または小分子は通過の際に拡散してゲルの粒子内に入り、行程が長く遅れて溶出されるが、大きい分子は入れずに素通りするため、より早く溶出されるのである(図 1)。Sephadex の網目の大きさには種々あり、それぞれ分画範囲が異なる(表 1)。

表 1. Sephadex の種類

名称	分画範囲
Sephadex G-10	< 700
G-15	< 1,500
G-25	1,000 ~ 5,000
G-50	1,500 ~ 30,000
G-75	3,000 ~ 80,000
G-100	4,000 ~ 150,000

本学生実習では、Sephadex G100 を用い、分子量 200 万の Blue dextran、43,000 の Egg Albumin、12,400 の Cytochrome c、255 の DNP-L-Alanine を混合したサンプルを注入し分離させている。分子量の大きい物質から流れ出てくる溶出液を順次採取し、280nm と、410nm の波長で吸光度を測定させる。それぞれの物質の溶出位置をグラフに書かせ、課題として『分子量〇〇〇のタンパク質は何処に溶出されるか?』を予測させている。

実習は 2 人 1 組で行わせる。カラムにゲルを詰めるところから始めて、50mM リン酸 Buffer(以下リン酸 Buffer)が、三角プラスチックからチューブを介して、自動的に流れ落ちるような装置を組ませる(図 2)。

ゲルは粉末の状態の販売されている。まず精製水で 24 時間かけて膨潤させ、そのあとリン酸 Buffer で 2~3 日間かけて置換したものを使用する。

実際は毎年新しいゲルを使用する訳ではなく、保存したものを再利用している。保存には数日かけて精製水に置換した後、防腐剤として 0.01%のアジ化ナトリウムを加えて冷蔵している。

サンプルは

DNP-L-Alanine(黄色) 48mg
Blue dextran(青色) 120mg
Cytochrome c(茶色) 300mg
Egg Albumin(無色) 1,200mg

を 50mM リン酸 Buffer 12mL に溶かしたものである。このサンプルを作製する手順は、まず 12mL の 50mM リン酸 Buffer を 30mL ビーカーに入れ、上から順にスターラーで静かに攪拌しながら溶かし込んで行く。出来上がった溶液は冷凍保存する。

この実習に限らず、学生実習の前には必ず、機器のチェック、実習ガイドラインに記載された手順や

手技、作製した試薬の確認を目的として予備実験を行っている。

また、本実習ではゲルの詰め方(パッキング)とサンプルの注入方法のデモを、技術職員が行っている。

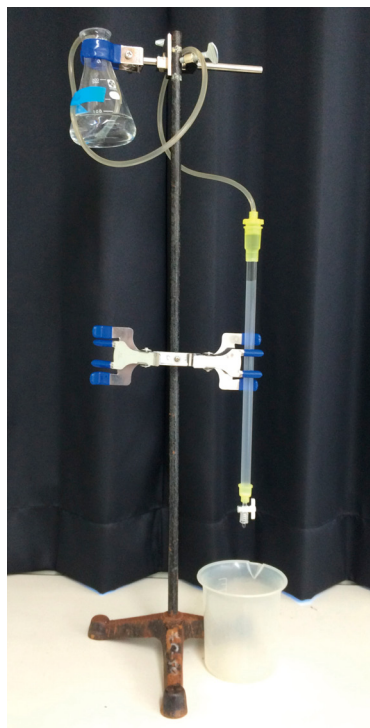


図 2. カラムクロマトグラフィー実験装置

2. カラムの変遷

1980 年当初のカラムは、内径 10mm のガラス管の片側の先端を細く加工し、その先にシリコンのチューブを接続、そちら側を底部とし、チューブはピンチコックで閉じていた。上部は中央に細いガラス管を通したゴム栓で蓋をし、そのガラス管を通じて Buffer を流していた。ゲルの流出を防ぐために、ガラス管の底にはガラスウールを敷くという、今にして思えば、指導に相当の労力を費やしていた実習であった。残念ながら数年前に廃棄してしまい、現物は手元にない。

1990 年からは、市販のカラム (BIO-RAD 製) に器具を一新した。カラムもキャップもコックもセットであつたもので、導入費用はかなりの額になったが、操作性が格段に向上し、手技の間違ひも激減して実習終了時刻が明らかに早くなった。

しかし、20 年以上使用すると、カラムも経年劣化により、接合部分から外れてしまい、使用出来なくなったものが多くなった。実習中にキャップを外すつもりで、接合部がとれてしまい、実験のやり直しをした事例もあった。

2012 年度の年度末に後継のカラムを購入し、2 度目のリニューアルをすることになった。

写真で見ても判るように、従来のカラムに比べてキャップ部分とコック付近の素材が透明になっていて、操作が判りやすいのでは、と期待された。

2013 年の秋学期の実習に備えて、事前に行った予備実験で新規購入したカラム (以下 New カラム) を使用したところ、溶出速度が著しく遅いこと

が判明した。具体的な数値の記録は残っていないが、従来のカラムより、1.5 倍程の時間がかかったと記憶している。

この結果に対して担当教員より、New カラムへの更新は当面見合わせるよう指示がされた。

本実習では濾液を 1mL ずつ試験管に採取させている。予め 1mL が何滴かメスシリンダーで計測させるのだが、およそ 17~18 滴になる。これを 30 本程採取するため、溶出速度が実習時間を左右することになる。カラム底部のフィルターは、使用を重ねる毎に壊れたゲルによって目詰りを起こし、それが溶出速度を下げ的原因となると考えられるため、この時点では新品での溶出速度の遅さはフィルターの仕様の変更のためかと思われた。



図 3. 旧カラム (左)、New カラム (右)

3. NEW カラムの DÉBUT

2013 年の段階では、旧カラムが学生グループ数以上あったため、当面それだけで実習をする事が出来た。

毎年、旧カラムは壊れて、少しずつ減っていった。それに反して毎年定員増で学生数は増えていった。

2016 年、旧カラムと学生のグループ数とが同じになり、とうとう 2012 年に購入した New カラムをデモで使わなければならなくなった。



図 4. 壊れたカラム

予備実験で New カラムを使用したところ、やはり、かなり溶出速度が遅いことが確認された。

ゲルをパッキングする段階から、溶出の遅さは顕著で、実習中のデモ用だけとしても、かなり問題があると思われた。

ところが、予備実験の 1 本目の採取から後半にすすむにつれて、徐々に流速が速くなっていったのである。最初は 120 秒以上かかっていたのが、20 本を過ぎる辺りでは、100 秒程になった。これは条件にも依るのだが、従来のカラムとほぼ同等の溶出速度であった。

このことから、数時間湿らせておけば、溶出速度がある程度担保出来るのではないかと推察し、デモに使用する New カラムに前日からリン酸 Buffer を入れておくことにした。

翌日の実習時のデモでは、やはり溶出速度が遅い印象はあったが、さほど影響なくデモを終えることが出来た。

学生実習は 1 学年を 3 つに分けて、3 週間で 3 項目をローテーションする形式で行なわれている。つまり 3 回同じ実験を繰り返すことになっている。

初回の実習が終わった後に、全ての器具の洗浄をするのだが、水道水で濯いだ際に、新旧のカラムの流れ方にあまり差がないような印象があった。

残り 2 回の実習でも、遅くとも前日からカラムにリン酸 Buffer を入れてデモを行ったが、2 回とも問題なく終わることができた。最終的にカラムを洗浄した際に、注意深く新旧の差を観察した結果、まったく差がないことが確認されたのである。

4. 今後について

New カラムであるが、次年度の学生数が今年度と変わらなければ、敢えて導入しないつもりである。しかし、何らかの要因で New カラムを学生に使用させる場合には、一斉に更新したいと考えている。

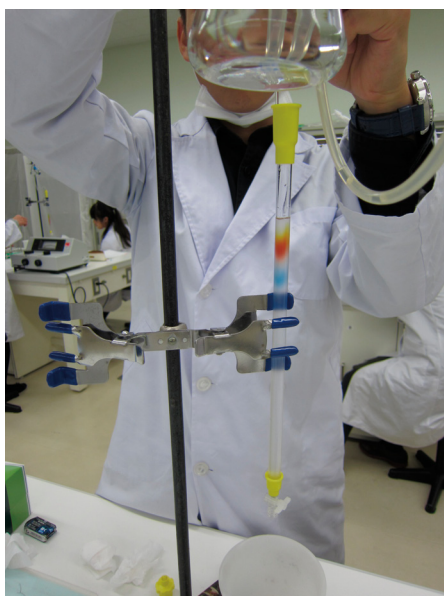


図 5. 実習風景 1

その際には、リン酸 Buffer 等で湿らせてから学生に提供する、あるいは流速が担保できるまで事前に何度か洗浄する、ことが必要であろう。

今回のことは経験したことが全てであって、文献などの裏付けはない。詳しい取扱説明書等には記載されていたことかもしれないが、購入時の添付の説明書では確認ができなかった。今後使う度毎に溶出速度が速くなることを望むものである。

5. おわりに

New カラムを使用する事になった場合、これまでより溶出に 1.5 倍以上の時間がかかることを覚悟していたので、今回の結果は僥倖であった。

実際、学生実習において、一度試して良い結果でなかった場合、もう一度復活することはまず無い。

今回は代替品がないこともあり、不適を承知で敢えて使用した結果、解決の方向性を見出すことが出来た。

学生実習の場合、準備には時間的制約があるため、問題が起きた時に、解決を模索する余裕があまり無い。今回もカラムの数が足らなくなってから、対策を考えたものであり、予備実験の段階で方向性が見いだせたのは幸運だったといえる。

6. 謝辞

本実習をご担当下さり、熱心に学生の指導にあたって下さっている、医学医療系分子細胞生物学の水野智亮助教、須田恭之助教、木村雄一助教にこの場をおかりして深く御礼申し上げます。

参考文献

筑波大学医学群医学類 医学の基礎 (上) 実習ガイドライン 第 43 回生用 コース#3 分子細胞生物学 - 細胞と遺伝子- タンパク質 (2016)



図 6. 実習風景 2

On trial at column renewal for student practice

Mayumi Abe, Kazumi Osato

Technical Service Office for Medical Sciences, University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8577 Japan

Keywords: student practice, column chromatography, gel filtration