

# ヘモグロビンのカラムクロマトグラフィー

4班：尾田 正仁（11M0096F）

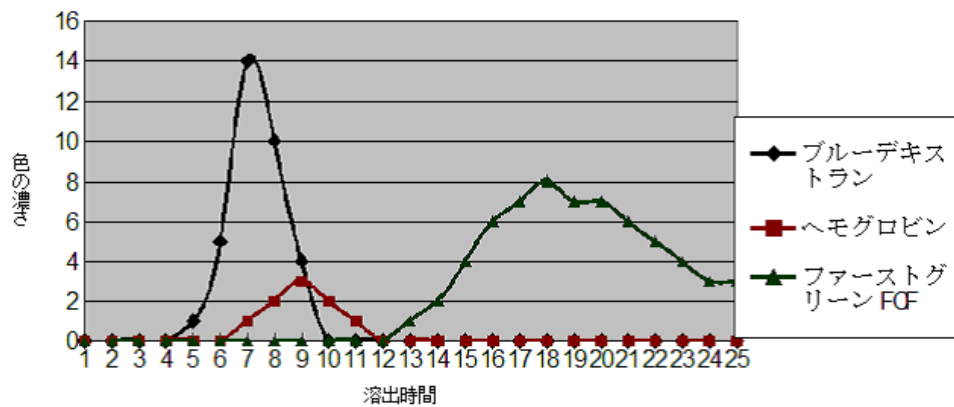
実習日：2012年11月19日

# 結果

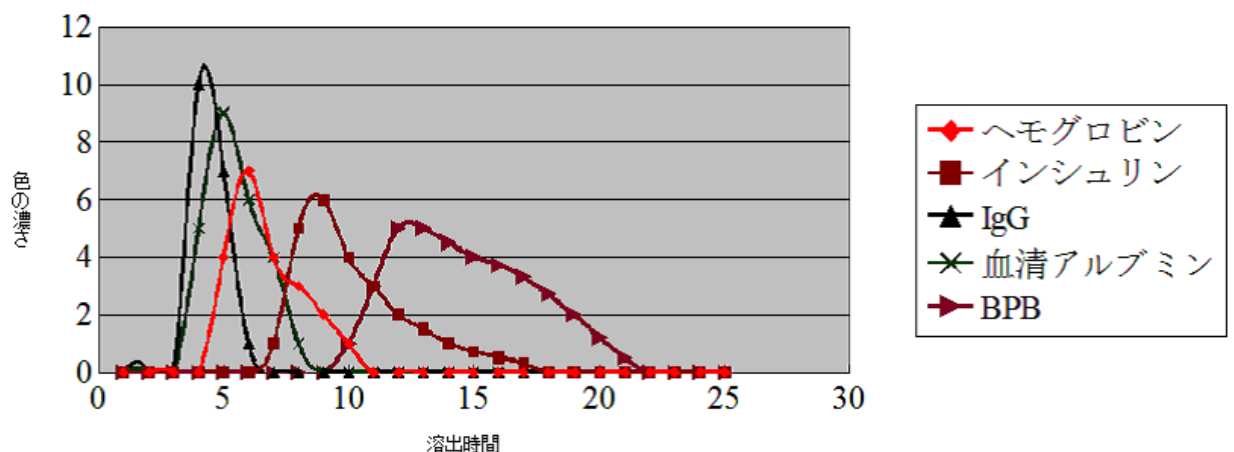
| 番号 | ヘモグロビン | ブルーデキストラン | ファーストグリーン FCF |
|----|--------|-----------|---------------|
| 1  | 0      | 0         | 0             |
| 2  | 0      | 0         | 0             |
| 3  | 0      | 0         | 0             |
| 4  | 0      | 0         | 0             |
| 5  | 1      | 0         | 0             |
| 6  | 5      | 0         | 0             |
| 7  | 14     | 0         | 0             |
| 8  | 10     | 1         | 0             |
| 9  | 4      | 2         | 0             |
| 10 | 0      | 2         | 0             |
| 11 | 0      | 3         | 0             |
| 12 | 0      | 2         | 0             |
| 13 | 0      | 1         | 1             |
| 14 | 0      | 0         | 2             |
| 15 | 0      | 0         | 4             |
| 16 | 0      | 0         | 6             |
| 17 | 0      | 0         | 7             |
| 18 | 0      | 0         | 8             |
| 19 | 0      | 0         | 7             |
| 20 | 0      | 0         | 7             |
| 21 | 0      | 0         | 6             |
| 22 | 0      | 0         | 5             |
| 23 | 0      | 0         | 4             |
| 24 | 0      | 0         | 3             |
| 25 | 0      | 0         | 3             |

# 考察

- (1) 今回の実習では一度混ぜてしまったサンプルをいかに分画をするかというものであった。分画をするために用いた方法はゲルによるろ過である。Sephadex-100 は多孔性のゲルであり、分子量の大きい分子は担体の内部に入れないため、素通りして短時間で溶出される。ところが、分子量の小さい分子は担体内部に入り込んでしまうため、長時間カラムに留まることになる。今実習で用いた試料はヘモグロビン（分子量 64.5kDa）、ブルーデキストラン（分子量 2000kDa）、ファーストグリーン FCF（分子量 809Da）であった。実際に分子量のもっとも大きいブルーデキストランがまず最初に溶出された。次に、ヘモグロビン、ファーストグリーン FCF の順で溶出された。また、分子量の小さいものほど溶出される時間が長かった。
- (2) 以下は結果の表を元に作成したグラフである。



- (3) ヘモグロビン (分子量 64.5kDa)、インシュリン (分子量 5800)、IgG (分子量 150kDa)、血清アルブミン (分子量 69kDa)、BPB (分子量 692) 亜硝酸ナトリウムの混合液をカラムクロマトグラフィーにかける。生理条件下であるため、それぞれのタンパク質の構造が変わることはない。上述の考察から分子量の大きい分子ほど早く溶出される。また、分子量の小さい分子ほど溶出される時間が長いと考えられる。以上から、予想されるクロマトグラムの概略は以下の通り。



- (4) 実際の実習ではヘモグロビンがほとんど見て取れなかったが、以下、予想されるヘモグロビンの色の変化について考察する。混合物である亜硝酸ナトリウムが、ヘモグロビンの  $\text{Fe}^{2+}$  を酸化させ  $\text{Fe}^{3+}$  となりメトヘモグロビンとなる。メトヘモグロビンは酸素結合、運搬的能力がない。そのため、酸素と結合しているヘモグロビンに比べ、暗い色になると考えられる。ちなみに、メトヘモグロビン血症の治療には  $\text{Fe}^{3+}$  を還元するメチレンブルーが用いられる。
- (5) 主観による濃度の測定であったため、なかなか難しかった。ImageJ を用いて色の濃さを測定しようと考えたが、赤、青、緑それぞれの色による濃度測定方法が理解できずに、結局のところ目視による測定になってしまった。このような実験では、客観的なデータが必要不可欠であるため、様々なツールを活用できるようにしたい。