

機能性関与成分 MBP（乳塩基性タンパク質）の定量試験

1. 概要

- ・固形分が約 9%程度の乳酸菌飲料より、特定の性質を持つタンパク質（MBP（乳塩基性タンパク質））を樹脂カラムにて回収する。回収したサンプルのタンパク質量をケルダール分析等により測定し、特定の性質を持つタンパク質量として算出する。

2. サンプル

- ・固形分約 9%の乳酸菌飲料（pH 約 4.0） 100g

3. 機器・試薬

（1）機器

- ・プレパックカラム [REDACTED] : 5mL
- ・カラムホルダー [REDACTED] : 5mL 用
- ・プラグ
- ・3方ストップコック
- ・チューブポンプ
- ・シリコンチューブ
- ・メスシリンダー

（2）試薬類

- ・ [REDACTED] M NaCl
- ・ [REDACTED] M NaCl (pH [REDACTED])
- ・ 1 N NaOH
- ・ 超純水（Milli-Q水）（事前に脱気しておく。）

4. 方法

（1）サンプルの前処理

- ・サンプルを冷凍保存している場合は、分析当日に室温にて融解後、氷上にて静置保持する。
- ・サンプルを 100g 秤量する。
- ・1 N NaOH を加えて pH が [REDACTED] となるように調整する。
- ・前処理済みサンプルとして、全量を分析に使用する。

（2）陽イオン交換樹脂カラムの準備

①事前準備

- ・ペリスタポンプにチューブをセットし、Milli-Q水を通液して気泡を抜く。
- ・チューブとプラグおよび3方ストップコックつきチューブを接続する。
- ・送液スピードを 1.4ml/min に設定する。（メスシリンダーを用いて確認する。）

②陽イオン交換樹脂カラムの設置

- ・陽イオン交換樹脂カラムに付属の説明書に従い、カラムをカラムホルダーにセットする。

（入口エンドをカラムに取り付ける際に、気泡が入らないように注意する。入口エンドをカラムに取り付けた後は、すぐにエンドプラグを取り付ける。カラムホルダーセット後に出口プラグを取り付けた後も、すぐにエンドプラグを取り付ける。）

- ・カラムホルダーを入り口が上、出口がしたとなるようにクランプに取り付ける。
(クランプ取り付けの際、水平器を用いカラムに傾きがないことを確認する。)

③カラムの入口付近の気泡の押し出し

- ・カラムへの取り付け前に送液チューブの流路内に気泡がないことを確認する。
- ・入口エンドのエンドプラグをつけたまま、出口エンドのエンドプラグを外す。
- ・送液チューブとつながったプラグを出口エンドに取り付ける。
- ・入口エンドのエンドプラグを外す。
- ・氷上に置いた Milli-Q 水を出口側からカラムに通液 (1.4ml/min) して、入口側の気泡を押し出す。
- ・気泡が出なくなったら通液を一時停止する。
- ・入口エンドのプラグ接続部 (ねじ穴) には、気泡が残りやすいため特に注意して確認する。

④流路の形成

- ・入口エンドにエンドプラグを取り付ける。
- ・出口エンドの送液チューブを外し、エンドプラグを取り付ける。
- ・送液チューブの流路内に気泡がないことを確認し、入口エンドのエンドプラグを外し、送液チューブを取り付ける。
- ・入口エンド側の三方コックのコックすべてを閉塞状態にしてから、出口エンドのエンドプラグを外す。
- ・出口エンドにプラグおよび3方ストップコックつきチューブを取り付ける。

(3) 陽イオンカラムへの通液

① 水洗

- ・MilliQ 水 (氷冷) をカラムに 50ml 通液する。(速度: 1.4ml/min)

② 平衡化

- ・■ M NaCl をカラムに 25 ml 通液する。(速度: 1.4ml/min)
(溶液交換時に気泡が入らないように注意する。)

③ 水洗

- ・溶液変更の際の溶液の混合を防ぐため、5 秒程度、空気を吸わせ、流路内に気泡を入れる。
- ・MilliQ 水 (氷冷) を通液する。(速度: 1.4ml/min)
- ・気泡が 3 方コック直前まで来た時点で通液を一時停止する。3 方コックにより、カラムへの流路を閉塞した後、通液を再開して気泡を流路より除く。
- ・MilliQ 水 (氷冷) をカラムに 50ml 通液する。(速度: 1.4ml/min)

④ サンプル通液

- ・前処理済みのサンプル溶液(氷冷)全量をカラムに通液する。(速度: 1.4ml/min)
(溶液交換時に気泡が入らないように注意する。気泡が入った場合は、③を参考に気泡を抜く。)

⑤ 水洗

- ・5 秒程度、空気を吸わせ、流路内に気泡を入れる。
- ・MilliQ 水 (氷冷) を通液する。(速度: 1.4ml/min)
- ・気泡が 3 方コック直前まで来た時点で通液を一時停止する。3 方コックにより、カラムへの流路を閉塞した後、通液を再開して気泡を流路より除く。
- ・MilliQ 水 (氷冷) をカラムに 80ml 通液する。(速度: 1.4ml/min)

⑥ 溶出 (溶出液は、氷冷せず室温条件で溶出する。)

- ・5 秒程度、空気を吸わせ流路内に気泡を入れる。
- ・■ M NaCl を通液する。(速度: 1.4ml/min)

- ・気泡が3方コック直前まで来た時点で通液を一時停止する。3方コックにより、カラムへの流路を閉塞した後、通液を再開して気泡を流路より除く。
- ・ 0.1 M NaCl をカラムに 32ml 通液する。(速度：1.4ml/min)
- ・溶出液の通液開始時からカラムを通過した液を 32ml 回収し、全量をタンパク質量の測定に使用する。

5. タンパク質量の測定

- ・タンパク質量の測定はケルダール法にて行う。
- ・窒素・タンパク質換算係数には、牛乳・乳製品で一般的に用いられる 6.38 を用いて算出する。

以上

機能性関与成分 MBP（乳塩基性タンパク質）の定性試験

1. 概要

- ・製品中に含まれる MBP（乳塩基性タンパク質）の定性確認は、以下の手順により SDS-PAGE のバンドパターンにて実施する。

2. 試薬・機器

- ・電気泳動様ゲル：Peptide-PAGE mini 16% TEFCO 社製
- ・泳動バッファー：Tricine バッファー TEFCO 社製
- ・サンプルバッファー：トリシンサンプルバッファー BioRad 社製
- ・ゲル染色試薬：Bio-Safe CBB G-250 ステイン- BioRad 社製
- ・ゲル画像取り込み装置：ChemiDocMP BioRad 社製
- ・ヒートブロック
- ・電気泳動装置

3. サンプル

- ・「機能性関与成分 MBP（乳塩基性タンパク質）の定量試験」に従い、陽イオン交換樹脂を用いて MBP（乳塩基性タンパク質）を回収する。
- ・回収液を Milli-Q 水で適当に希釈後、等量のサンプルバッファーを加える。
- ・混合後、ヒートブロックにて 100℃・3 分間加熱処理する。
- ・速やかに氷上で冷却する。

4. 方法

- ・1 レーンあたりタンパク質として 0.5 μ g をアプライする。
- ・125V 定電圧、90～110 分間泳動する。
- ・ゲルを Milli-Q 水で 1 時間水洗後、Bio-Safe CBB G-250 ステインで 1 時間染色する。
- ・Milli-Q 水で水洗後、ゲルの画像を ChemiDocMP にて撮影する。
- ・分子量マーカー 75kDa、15kDa 付近に MBP（乳塩基性タンパク質）の主要なバンドが得られることを確認し、定性評価とする。

以上