

〔テクニカルノート〕

高圧セルロースアセテート膜等電点電気泳動法

戸田年総*・芝 紀代子**・長 裕子**

中尾 真***・大橋望彦*

はじめに

等電点電気泳動法は、蛋白質の僅かな荷電の違いをとらえて分離できる卓越した方法であるため、近年臨床検査の分野においても利用され始めているが、その支持体はアガロース^{1,2)}やポリアクリルアミドゲルに限られている。しかし、検査室で電気泳動の支持体として圧倒的に多く用いられているのはセルロースアセテート膜（セ・ア膜）である。取り扱いが容易であることから等電点電気泳動にもセ・ア膜を利用したいが、現在市販されている汎用の泳動槽を用い、従来の手引書通りに行っても鮮明な泳動像は得られず、実用的ではなかった。そこで我々は、2次元セ・ア膜電気泳動法³⁾の開発を行った経験をもとに装置と操作法の再検討を行い、セ・ア膜等電点電気泳動法に至適な専用装置と、検査室に適した標準操作法を開発した。

1. セ・ア膜等電点電気泳動槽

電気泳動装置一式の外観を Fig. 1-1 に、泳動槽の断面図を Fig. 1-2 に示す。この装置の第一の特徴は、セ・ア膜を載せる台が熱伝導の良いアルミブロックに変更された点である。その結果、高電圧での泳動に耐えるようになり、分離時間の短縮と分離性能の向上が同時に実現された。このアルミブロックは、冷却槽のアル

ミ板を介して氷水で冷却され、泳動中の膜面温度は常に2℃以下に保たれる。なお、このアルミブロックは、試料塗布時や洗浄時の操作性を考え、取り外しができる構造とした。第2の改良点は、高電圧で泳動を行っ

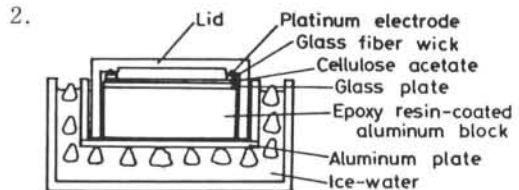
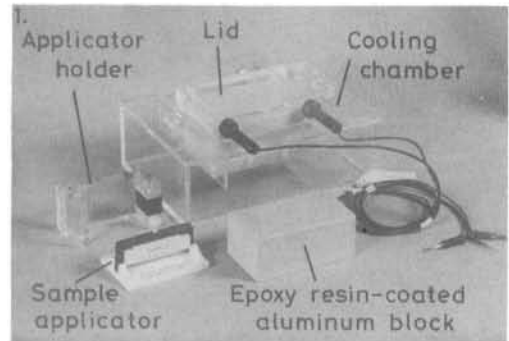


Fig. 1. Apparatus for high-voltage isoelectric focusing on cellulose acetate membrane.

1. Exterior view of a set of the apparatus.

2. Cross-sectional view of the electrophoresis vessel.

High-voltage isoelectric focusing on cellulose acetate membrane.

Tosifusa Toda*, Kiyoko Shiba**, Hiroko Cho**, Makoto Nakao*** and Mochihiko Ohashi*.

* 東京都老人総合研究所生化学部；Department of Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

** 東京医科歯科大学医学部付属病院検査部；Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University Hospital

*** 東京医科歯科大学医学部第1生化学；The First Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

Correspondence address: Tosifusa Toda, Department of Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

(受付 1987年9月12日, 受理 1987年10月1日)

ても膜の湿潤度が一定に保たれるよう、冷却台の大きさを膜の大きさにまで縮小し、蓋の天井も低くした(泳動槽内の空間を最小限にした)。また、アプリケーションを用いての血清塗布が行えるよう、市販のアプリケーションに合せて支持台を作製した。

2. その他の装置および器具類

サンプルアプリケーションはヘレナ研究所製の8検体用、マイクロピペットはドラモンド製の10 μ l用を使用。電源は1500Vまで出る定電圧電源であれば良いが、プログラム式電源(アナテックのModel-3110など)を用いると段階的昇圧を自動的に行うことができる。その他、固定、染色、脱色に用いるバット、液を吸い取るための濾紙、膜などを取り扱うためのピンセットが必要である。

3. セ・ア膜および薬品類

等電点電気泳動のセ・ア膜(セパラックス EF, 60 $\times$ 110mm)および両性担体(セパライン, pH3.5-10, 20%(W/V))は富士写真フィルム製を使用。クマジーブリリアントブルー G250(CBBG250)はシグマ製、ポリビニルアルコール(PVA, ゴーセノール GH-17)は日本合成製を使用。ショ糖、リン酸、エチレンジアミン、

スルホサリチル酸、トリクロル酢酸は試薬特級を、エタノール、酢酸、グリセロールは試薬一級を使用。

4. 試薬の調製

両性担体液: 20%(W/V) セパラインと20%(W/V) ショ糖液を等量混合して両性担体液とする。

陽極液: 30%(W/V) ショ糖液 10ml に対し濃リン酸を 0.1ml の割合で加えたもの。

陰極液: 蒸留水 10ml に対しエチレンジアミンを 0.1ml の割合で加えたもの。(エチレンジアミン原液は皮膚に付けないように注意)

蛋白固定液: 蒸留水 100ml に対しスルホサルチル酸を 20g の割合で溶解。

染色液: A液は、蒸留水 100ml に対してスルホサルチル酸 6.4g とトリクロル酢酸 10g の割合で溶解したもの。B液は、エタノール 100ml に対し CBBG250 を 0.12g の割合で溶解したもの。(A, B液いずれも室温で保存可能) 用時、A液とB液を等量混合して染色液とする。(混合液の保存は不可)

脱色液: A液は40%(V/V) エタノール, B液は20%(V/V) 酢酸液。用時に両液を等量混合して脱色液とする。

乾燥液: 蒸留水 100ml に対して PVA0.15g, グリセ

Table 1. Methods of high-voltage isoelectric focusing on cellulose acetate membrane.

1. Electrophoresis	2. Protein Staining
I. Supporting medium Separax EF (110 x 60 mm)	I. Fixing solution 20%(w/v) SSA
II. Carrier-ampholytes solution 10%(w/v) Sepaline, 10%(w/v) sucrose	II. Staining solution A: 6.4%(w/v) SSA, 10%(w/v) TCA B: 0.12%(w/v) CBB in ethanol Mix A and B (1:1) before use
III. Electrode wick Glass-fiber filterpaper (58 x 5 mm)	IV. Destaining solution A: 40%(v/v) ethanol B: 20%(v/v) acetic acid Mix A and B (1:1) before use
IV. Anolyte 1%(v/v) H ₃ PO ₄ , 30%(w/v) sucrose	V. Drying solution 0.2%(w/v) PVA, 7.5%(v/v) glycerol, 5%(v/v) acetic acid 0.01%(w/v) sodium azide
V. Catholyte 1%(v/v) ethylenediamine	VI. Procedure i. Fixing solution, 10 min ii. Staining solution, 6 min iii. Destaining solution, 30 min iv. distilled water, 1 min v. Drying solution, 15 min
VI. Procedure. i. pre-run: 500V, 30 min ii. sample application: 0.3 μ l iii. separation: 300V, 10 min 500V, 30 min 1,500V, 45 min	

ロール 7.5ml, 酢酸 5ml, 窒化ナトリウム 0.01g の割合で溶解 (室温で保存可能)。

5. 操作法

電気泳動の操作法の概略を Table 1-1, 蛋白染色法を Table 1-2 に示す。

〔1〕セ・ア膜の平衡化

① 60×110mm のセパラックス EF 膜を両性担体液に浮かべ、膜面下から液を均一にしみ込ませた後に液中に沈めて約 1 分間静置する。

② この膜を、アルミブロックに接着されたガラス板の上に、気泡が入らないように注意して載せる (Fig. 2-1)。

③ 濾紙を重ね、指先で擦って余分の両性担体液を吸い取る (Fig. 2-2)。

④ 濾紙を新しくし、直径 1cm 程度の試験管を両手で押え付けながら数回ころがせて、膜面の両性担体を均一化する (Fig. 2-3)。

〔2〕泳動槽の準備

① セ・ア膜を載せたアルミブロックを、泳動槽内の

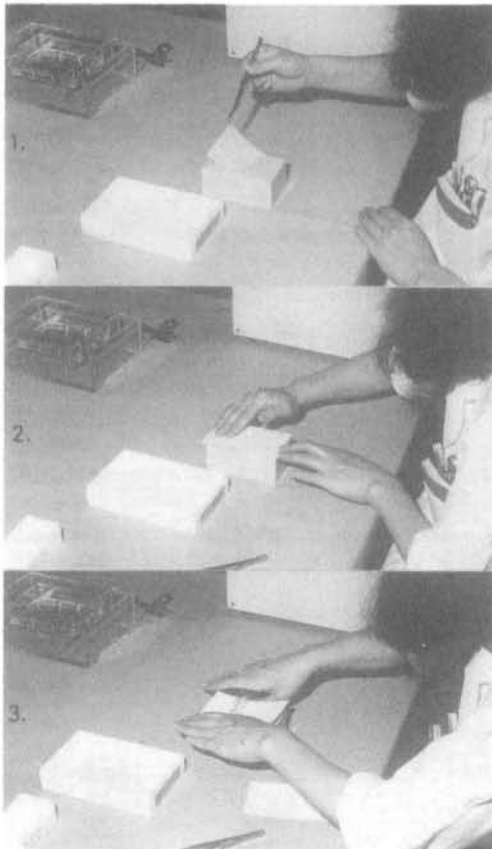


Fig. 2. Operations in high-voltage isoelectric focusing on cellulose acetate membrane I.

1. Separax EF membrane equilibrated with carrier-ampholyte solution was placed on the top of the epoxy-resin coated aluminum block.
2. Excess carrier-ampholyte solution was removed by first gently rubbing over a dry filterpaper with fingers. 3. Then a test tube was rolled over another filterpaper to achieve the uniformity of solution content.



Fig. 3. Operations in high-voltage isoelectric focusing on cellulose acetate membrane II.

1. Electrode wicks wetted with anolyte and catholyte respectively were placed at the positions for electrode attaching on the membrane. 2. Ice and water were put in the cooling chamber. 3. After the pre-run, samples of human sera were applied using an applicator.

アルミ板に載せる。

②セパラックス EF に添附された電極ウィック (5×58mm のガラス線維濾紙) 各 1 本ずつを、陽極液および陰極液にそれぞれ浸し、乾いた濾紙上に数秒間載せて余分の液を吸い取る。

③この電極ウィックを、セ・ア膜の両端 (白金電極が重なる位置) に置き、ピンセットで軽く押えて膜に密着させる (Fig. 3-1)。

④蓋を閉じ、電源コードを接続する。

⑤冷却槽に、氷と水を入れる (Fig. 3-2)。

[3] サンプルの塗布と電気泳動

① 500V で 30 分間、予備通電する。

②アプリーケーター用サンプルトレイの各溝に、マイクロピペットを用いて 5 μ l の血清を入れる。

③アプリーケーターをサンプルトレイの上で数回上下させ、先端の金属部分に血清を馴染ませ、一度濾紙に空塗布を行ってから、再び同じ操作を行って、塗布用のサンプルをアプリーケーターに採取する。(①, ②の操作は予備通電の終了直前に行う)

④アルミブロックを取り出し、陰極側にアプリーケーター支持台 (泳動槽に付属) をはめる。

⑤支持台にアプリーケーターを固定し、ノブを数秒間押して、セ・ア膜に血清を移す (Fig. 3-3)。1 回の操作で約 0.3 μ l 塗布される。

アルミブロックを泳動槽内に戻し、300V で 10 分間、500V で 30 分間、1500V で 45 分間、段階的に通電を行う。

[4] 蛋白質の染色および膜の乾燥

①泳動終了後、ただちにセ・ア膜を取り出し、固定液に 10 分間浸して蛋白質を固定する。

②染色液に 6 分間浸して、蛋白質を染色する。(時々液を揺する)

③脱色液に浸して振とうし、バックが白くなるまで脱色する。(約 5 分間ごとに 3 回程度、液を新しくする)

④蒸留水で 1 分間すすぎ、濾紙に挟んで余分の液を吸い取った後、乾燥液に 15 分間浸す。

⑤この膜をガラス板に張り付け、余分の乾燥液をティッシュペーパー等で十分に吸い取った後、室温で一晩 (または 37~50℃ の乾燥器で 1 時間以上) 乾燥する。

⑥ガラス板から剥がし、写真保存用のトレファン袋に入れて保存する。観察および写真撮影は、透過光に行う。

おわりに

本法 (高圧セ・ア膜等電点電気泳動法) で血清の分離を行った結果、分離能、再現性ともに十分満足のいく泳動像が得られ、操作性の点でも検査室での使用に適した方法であることが確かめられた。至適条件の検討内容、および分離結果の詳細については別途報告する^{4,5)}。

文 献

- 1) Sano, K. et al.: Clin. Chim. Acta, **137**: 115, 1984.
- 2) 島尾和男: 生物物理化学, **31**: 37, 1987.
- 3) Toda, T. et al.: Anal. Biochem., **119**: 167, 1982.
- 4) Toda, T. et al.: Electrophoresis (in press)
- 5) 芝 紀代子, 他: 生物物理化学 (投稿中)