

〔原 著〕

高圧セルロース・アセテート膜等電点電気泳動法の 至適泳動条件に関する基礎的研究

芝 紀代子*・戸田年総**・長 裕子*・田中比露美***
飯島史朗*・大橋望彦**・中尾 真****

SUMMARY

The apparatus, procedure and optimized electrophoretic conditions for high-voltage isoelectric focusing on cellulose acetate membrane were reported previously. This report focuses on the steps taken to derive at the optimum conditions specified. Temperature of the membrane was maintained below 2 °C even at 1500 V by cooling with ice water. The membrane was kept moist by the addition of 10 % (W/V) sucrose to the carrier-ampholyte solution. Pre-focusing at 500 V for 30 minutes was run to obtain a pH gradient on the membrane. 30 % (W/V) sucrose was added to the anode solution to prevent drying of the anode wick. The optimum conditions allowed a linear pH gradient between pH 3.5 to 8.5 to be obtained and consequently sharp protein fractionation patterns.

Key words: isoelectric focusing, cellulose acetate membrane, serum protein fraction, Sepaline.

緒 言

実験材料及び方法

セパラックス EF は等電点電気泳動用に開発された膜であるが、専用の泳動装置及び至適な泳動条件が設定されていなかったため、再現性が悪く使えないというのが一般的な評価であった。この点を解決すべく泳動装置及び泳動条件の検討を行い、前報¹⁾で報告したごとくに設定することができた。本論文では再現性のよい泳動像が得られるまでに行った泳動条件の基礎的検討事項について報告する。

1. 実験材料

血清は当大学付属病院入院及び外来患者血清で既に検査済みのものを用いた。

2. 実験方法

基本的には前報¹⁾に記載した方法によったが、泳動条件の異なるものについては個々に述べる。

Basic study of the optimum electrophoretic conditions for high-voltage isoelectric focusing on cellulose acetate membrane.

Kiyoko Shiba*・Tosifusa Toda**・Hiroko Cho*・Hiromi Tanaka***・Shiro Iijima*・Mochihiko Ohashi**・Makoto Nakao****

*東京医科歯科大学医学部附属病院検査部

**東京都老人総合研究所生化学

***東京医科歯科大学医学部附属病院臨床検査技師学校

****東京医科歯科大学医学部第1生化学

Correspondence address; Kiyoko Shiba, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University Hospital, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.

(受付 1987年12月10日, 受理 1988年1月26日)

結 果

1. 両性担体液の組成

両性担体液の種類：異なる両性担体を使用した場合の分離能について検討した。サンプルには種々疾患患者血清を用いた。

Fig. 1-(1)はアンホライン pH 3.5~9.5 (LKB 社製), Fig. 1-(2)はセパライン pH 3.5~10.0 (富士写真

フィルム社製)を用いた場合の泳動パターンを示す。いずれも両性担体濃度は10%(W/V)とし、10%(W/V)の蔗糖をふくむ液とした。セパラインを用いると鮮明なバンドが得られ、分離能も優れており多数の蛋白バンドが検出された。特にアルブミンから中性付近までの領域の分離が良好であった。一方アンホラインはセパラインと比較すると分離が悪く、シャープな蛋白バンドは検出されなかった。しかも特にアルブミン分

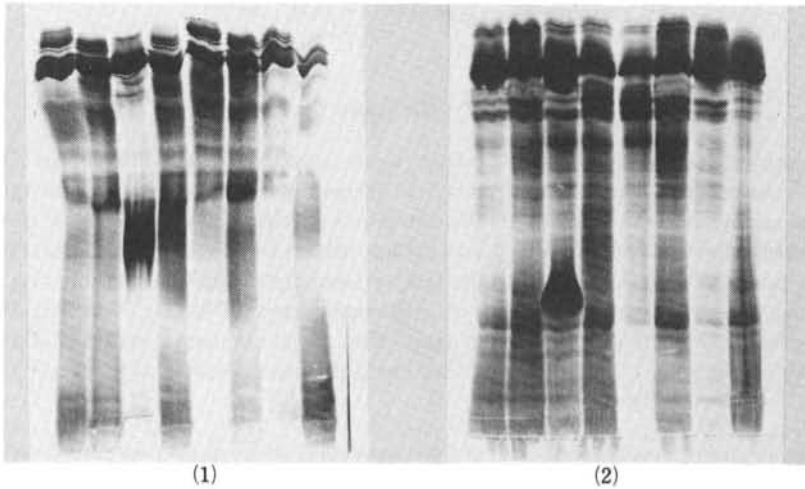


Fig.1. Effect of different ampholyte solutions on the protein fraction patterns.

(1) 10% (W/V) Ampholine (LKB). (2) 10% (W/V) Sepaline (Fuji).

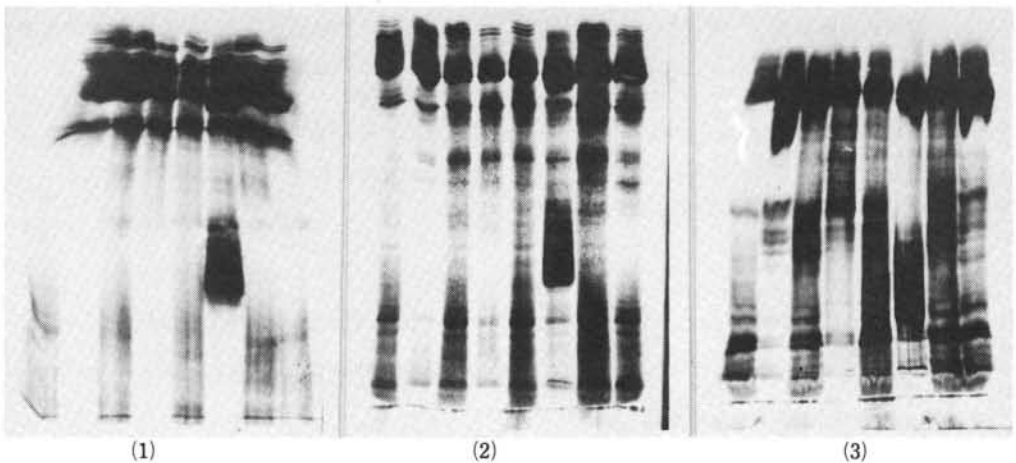


Fig.2. Effect of different Sepaline concentration on the protein fraction patterns.

10% (W/V) sucrose was added in all 3 cases. (1) 5% (W/V) Sepaline, (2) 10% (W/V) Sepaline, (3) 15% (W/V) Sepaline.

画に見られるように波打ち現象が見られ、応々にして泳動像の曲がりが見られた。セパラックス EF を支持体とした場合アンホラインに比べセパラインの方が良好な分離を示すことから、両性担体としてはセパラインを用いることにした。

両性担体の濃度：使用するセパラインの濃度について検討した。Fig. 2-(1)は 5% (W/V)、(2)は 10% (W/V)、(3)は 15% (W/V) 濃度で、いずれも 10% (W/V) 蔗糖を含んでいる液を両性担体液とした時の血清蛋白分画泳動像である。5% (W/V) では緩衝能が不足し、蛋

白により pH 勾配がくずれるために蛋白バンドの分離が悪く、特にその傾向は中性付近のバンドに顕著に見られた。10% (W/V) では非常に鮮明な分離像を示し、波打ち現象もほとんどみられなかった。セパライン量を 15% (W/V) にするとかえって不鮮明な泳動像となった。以上の結果よりセパライン濃度は 10% (W/V) を用いることにした。

両性担体液中の蔗糖濃度：両性担体液に添加される蔗糖の効果を確かめるために、その濃度を 0~20% (W/V) の範囲でかえて見た。Fig. 3 に示すように、蔗

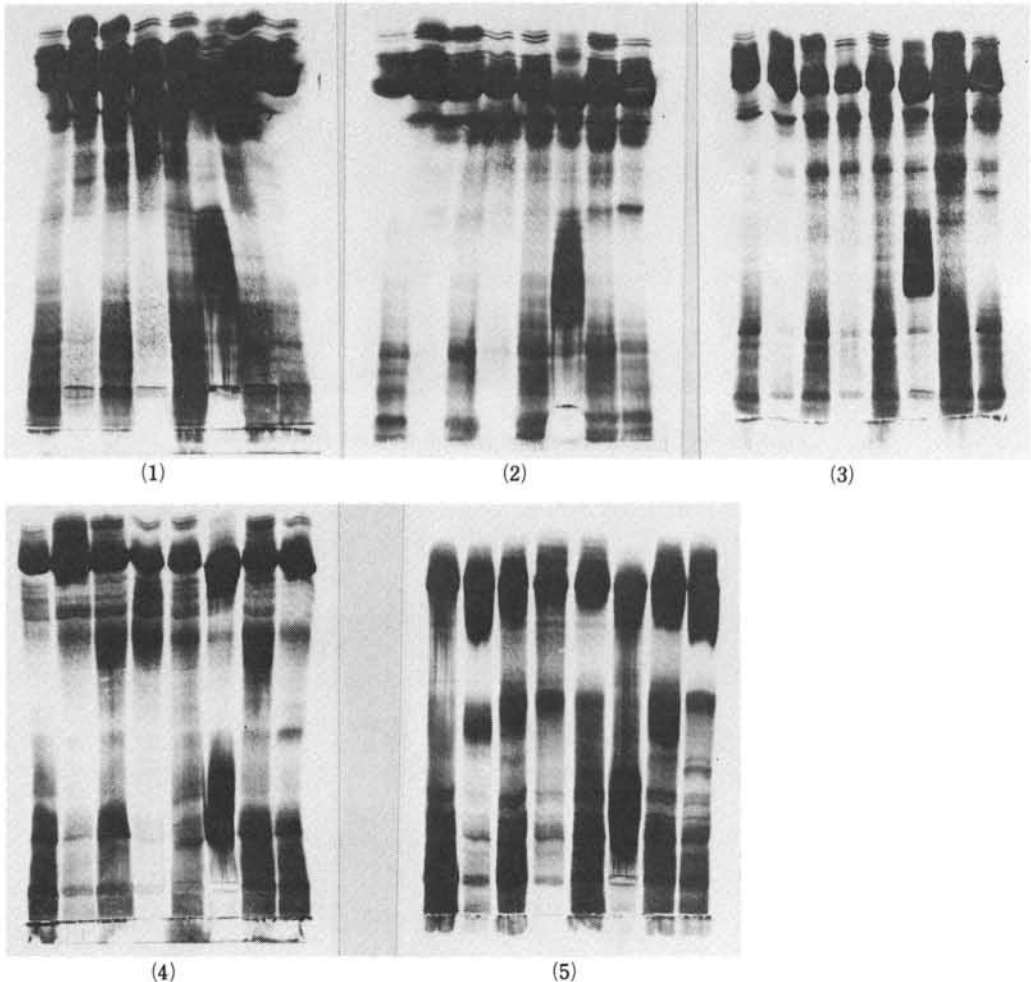


Fig.3. Effect of different sucrose concentrations on the protein fraction patterns.

Sepaline concentration was at its optimal of 10% (W/V). (1) 0% (W/V) sucrose, (2) 5% (W/V) sucrose, (3) 10% (W/V) sucrose, (4) 15% (W/V) sucrose, (5) 20% (W/V) sucrose.

糖を全く加えない場合、泳動中に膜が乾燥しやすく、Fig. 3-(1)のように泳動レーンにゆがみが生じ、また波打ち現象も見られた。5% (W/V)にすると Fig. 3-(2)のように波打ち現象はいくらか軽減されたがやはり泳動レーンのゆがみは解決されなかった。10% (W/V)を用いると Fig. 3-(3)のごとく良好な泳動像が得られた。しかし15% (W/V)、20% (W/V)とさらに高濃度になると泳動像の分離はかえって不良となった。特に20%

(W/V)では多量に含まれるアルブミンの固定が非常に悪くなった。最も良好な分離を示した10% (W/V)蔗糖濃度を至適条件として用いることにした。

2. 冷却方法

冷却方法による泳動像の相違を見た。Fig. 4-(1)は全く冷却を行わなかった場合、(2)は膜の下側からのみ冷却を行った場合、(3)は膜の下側からの冷却に加えて、膜の横方向からの冷却を行った場合である。冷却を行

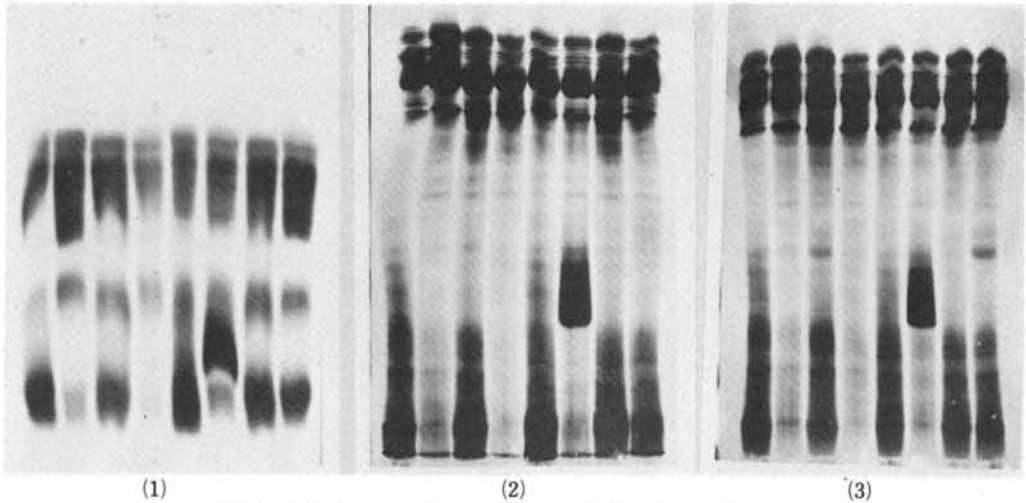


Fig.4. Effect of cooling on the protein fraction patterns.

Colling (1) Nil ; (2) Only from below ; (3) From below and sides.

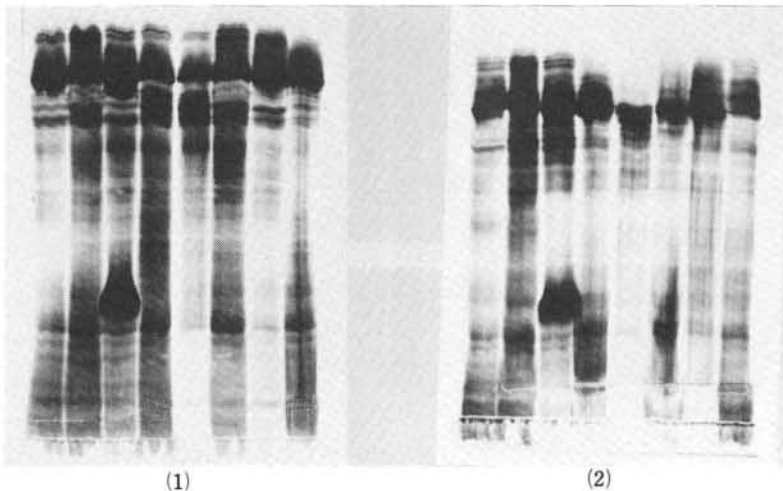


Fig.5. Effect of the pre-run step on the protein fraction patterns.

(1) Pre-run was carried out at 500V for 30min. (2) Pre-run was omitted.

わないと(1)のごとく泳動距離が短くなるだけでなく分離が非常に悪かった。膜の下側からのみの冷却では(2)のごとく泳動距離が短くなる現象はないが、中性からアルカリ性側の蛋白バンドの分離がやや不鮮明となった。最も良好な泳動像が得られたのは(3)であることから本法の専用装置では(3)の冷却方式を採用した。

3. 予備通電の効果

予備通電の必要性についてみた。Fig.5-(1)は予備通電を行った場合、Fig.5-(2)は予備通電を行わなかった場合の泳動像である。予備通電を行わないと全体的に蛋白バンドのフォーカスが悪く、特にその傾向は中性

付近のバンドで顕著に見られた。このことから500V、30分の予備通電を行った後、サンプルを塗布することにした。

4. 陽極液中の蔗糖濃度

セルロースアセテート膜等電点電気泳動では、泳動中に陽極側からの膜の乾燥が生じやすく、このため泳動像の再現性が悪くなる傾向がある。これを防ぐために陽極液中の蔗糖の至適濃度を調べた。終濃度0、10、20、30% (W/V) 蔗糖濃度を含む陽極液について検討した結果を Fig. 6 に示す。蔗糖を全く加えないと特に電極端に位置するバンドの歪みがみられた。蔗糖濃度を

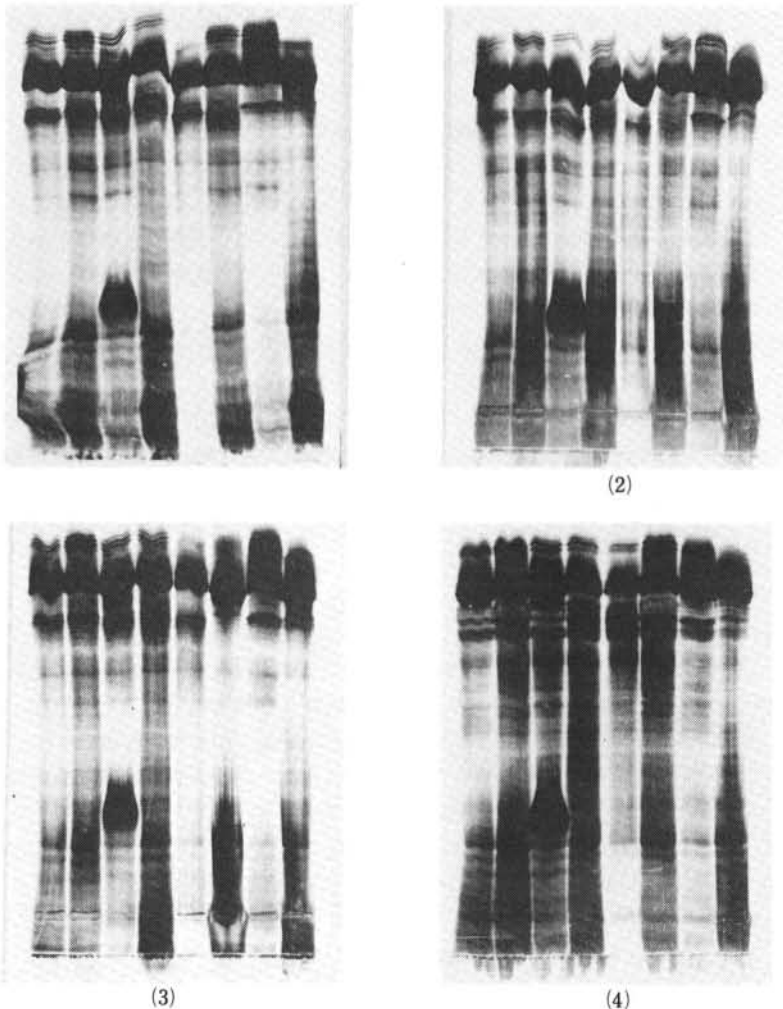


Fig.6. Effect of the different concentration of sucrose in the anode solution on the protein fraction patterns.

(1) 0% (W/V) sucrose, (2) 10% (W/V) sucrose, (3) 20% (W/V) sucrose, (4) 30% (W/V) sucrose.

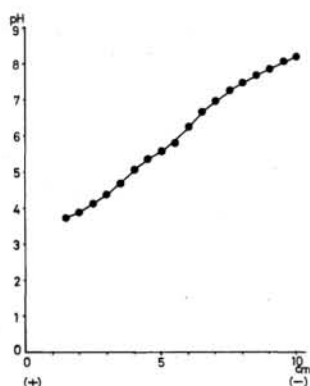


Fig. 7. pH gradient.

増すに従い、各蛋白バンドがフォーカスし、その傾向は特に中性付近のバンドで強くみられた。これらの結果からみると蔗糖濃度は高いほうが分離能にすぐれ、しかも常に再現性も良好であったところから、蔗糖は終濃度30% (W/V)とした。

5. pH 勾配

本法で得られた pH 勾配を Fig. 7 に示す。pH の測定には 3 枚のセルロースアセテート膜を重ねて常法通り泳動したのち、膜を 5 mm 幅に切り取り、1 ml の蒸留水中に入れて 1 時間振とう抽出し、微量 pH 電極(日立堀場製)で各液の pH を測定した。Fig. 7 に示すごとく、pH 3.5~8.5 までほぼ良好な直線的な pH 勾配が得られた。

考 察

セバラックス EF を用いるにあたり、良好な泳動像を得るに至るまでの基礎的な検討を行った。両性担体にはセパラインを選択した。アンホラインに比較し、セパラインを用いると酸性から中性付近にかけての分離が特に優れていた理由としては①酸性からアルカリ性にわたって均一に両性担体成分が分布している、②同一濃度、同一電圧条件で泳動した場合の発熱量が少ない、③両性担体の分子量が小さく pH 勾配形成速度が速いことなどが考えられる。③に関してはすでに証明されている²⁾。セパライン濃度は 10% (W/V) とした。それ以上例えば 15% (W/V) にすると Fig. 2-(3) のごとく不鮮明なパターンとなった。これはセパライン濃度が増すと両性担体液の膜へのしみ込みが悪くなり、またろ紙での両性担体液のふき取りも一定しないためか発熱量が多くなることが原因と考えられる。

セパラインは pH 3.5~10.0 の広範囲の両性担体が

あるが、応々にしてより分離能をあげるため pH 範囲の狭い両性担体を混じることがある。血清蛋白には pI 4~6 付近に等電点をもつ蛋白が多いところから、10% (W/V) セパラインのほか 2.5% (W/V) の濃度でセルバライト(セルバ社) pH 4~6 を混じたものを両性担体液として泳動したところ鮮明な泳動像が得られ、しかも pH 5~7 付近の蛋白バンドの分離が非常に良好であった。このことから分離する目的に応じて、狭い pH 範囲の両性担体液を混じると分離能がさらに上げられることが明らかとなった。

両性担体液は 10% (W/V) 蔗糖混合液とした。蔗糖を加えないと膜の乾燥が生じやすく不鮮明なパターンとなる。一方 10% (W/V) 以上に濃くすると、蛋白固定時にスルホサリチル酸が膜に十分しみ込まないためか、蛋白の固定が悪くなった。

冷却方式については膜の下側からの冷却に加え膜の横方向からの冷却を行うこととした。横方向の冷却をも行うことにより、膜面の温度がより均一になるため、常に再現性のよい良好な泳動像が得られるものと考えられる。サンプル塗布前に 500V、30 分の予備通電を行うこととした。これは等電点電気泳動では初期に大量の電流が流れるため蛋白が変性する可能性もあるので、これを避けるためと pH 形成に関して蛋白自身が均一な通電を妨害する作用をもつので pH 勾配形成までは蛋白を塗布しないほうがより良好な pH 勾配が得られると考えたためである。事実予備通電を行ったほうがより鮮明な泳動像と良好な pH 勾配が得られた。

ま と め

新たに開発された泳動装置を用いて、セルロースアセテート膜等電点電気泳動法に至適な泳動条件を基礎的に検討した結果について報告した。本法は操作が簡便で操作法通りに行えば再現性の良い泳動パターンが得られることから、手軽に等電点電気泳動が行えるという利点がある。またセルロースアセテート膜は 1 枚のみならず 3 枚重ねての泳動もできるので、一回の泳動で PAS 染色や酵素抗体染色法などの異なった染色を施し、相互にパターンを比較することも可能である。

文 献

- 1) 戸田年総, 他: 生物物理化学, 31(6): 435, 1987.
- 2) 上田哲也, 他: 富士写真フィルム SEPALIN 技術資料.