

〔一般演題〕

P 4. 高圧セルロースアセテート膜等電点電気泳動法における電子冷却装置の開発とその応用

○井上潤子・鈴木 武 (富士写真フイルム)
 長 裕子・芝紀代子 (東京医歯大・医・検・生化学)
 飯島史朗・木村 都 (共立薬大・毒性研)
 戸田年総 (都老人研・分子生物学)

(はじめに)

我々はセバラックスEF膜(以下セア膜)を支持体とする等電点電気泳動装置の開発、至適泳動条件の設定及びその応用について本学会において報告してきた。従来開発された泳動装置は氷水により冷却を行うもの(以下氷水冷却装置)であるが、氷が入手不可能な施設でもセア膜の等電点電気泳動が行えることが望まれてきた。そこで今回電子冷却を用いた泳動装置(以下電子冷却装置)を新たに開発した。従来の氷水冷却装置とのデータの互換性があるように二つの泳動方法を対比しつつ、至適条件についても検討したので報告する。

(材料及び方法)

材料:東京医科歯科大学医学部付属病院患者血清及び職員

の血清を用いた。
 電子冷却装置:新たに開発した装置は空冷式サーモジュールにより冷却を行うよう製作した。冷却温度は -2°C ~ 20°C の範囲内で温度を設定できるようにした。

電気泳動法:電子冷却装置の場合、設定温度を 7°C とし、 $300\text{V}10\text{分}$ 、 $500\text{V}30\text{分}$ 、 $1500\text{V}45\text{分}$ 通電する従来の泳動条件に更に $2000\text{V}5\text{分間}$ の泳動を追加した。氷水冷却装置の場合にも $2000\text{V}20\text{分間}$ の泳動を追加した。

イムノプロットング法:泳動後ただちにセア膜を5%スルホサリチル酸により固定を行っていたのを、泳動が終了後直接PVD F膜を密着させて転写を行うようにした。

(結果と考察)

1) 電子冷却装置の至適泳動条件:設定温度を0, 4, 7, 10, 15°C と変えて泳動を行ったところ、 7°C の時に一番良好な泳動像が得られた。 7°C までは設定温度が高くなるほど分離が良かったが、 7°C を越えると冷却が不十分となるためバンドに歪が生じた。

従来 $1500\text{V}45\text{分}$ で泳動を終了していたが、試しに 2000V の泳動条件を加えたところバンドが更に鮮明になった。そこで 2000V の通電を5分~20分間行ったところ、5分間のときに鮮明な泳動像が得られ、それ以上通電を行うとかえってバンドに歪が生じた。これらの結果より電子冷却装置の泳動条件は設定温度を 7°C 、通電条件を従来の条件に更に $2000\text{V}5\text{分間}$ 加えることにした。

2) 氷水冷却装置との互換性:電子冷却装置の至適条件によ

り得られた泳動像が、氷水冷却装置で従来の泳動条件で行った泳動像より分離が良くなった。そこで氷水冷却装置でも 2000V の条件を加え、両装置の泳動像が一致するような条件を検討した。 2000V の通電時間を10, 15, 20, 25分間と変えて泳動したところ、20分間で電子冷却装置の泳動像とほぼ一致する泳動像を得たので、氷水冷却装置の泳動条件にも $2000\text{V}20\text{分間}$ を追加することにした。

3) 泳動像の蓋の多様性:塗布時に結露を生じないように泳動槽の蓋を開けずに塗布するよう工夫し、そのアプリケーションターとしてファルマシア社製のサンプルアプリケーションターを用いていた。今回新たにヘレナ社製のサンプルアプリケーションターで塗布できる蓋も作成した。2つの方法で塗布した場合泳動像の分離は全く同じであるが、各泳動像のバンド巾がファルマシア社製は約4mm、ヘレナ社製は約5.5mmであり、ヘレナ社製の方がバンド巾が広いだけ見やすい泳動像を得ることができる。簡便で使用検体量も少なくてすむという点ではファルマシア社製のアプリケーションターの方が良い。蓋を変えるだけで用途に応じて塗布方法を選択できるようにした。

4) 両性担体液:セバライン(pH3.5~10)のみを用いていたが、セバラインとpH範囲の狭い両性担体とを混ぜた両性担体液(4.5%セバライン(pH3.5~10)-4.5%セバライン(pH4~6)-1%セルバライト(pH9~11)-ショ糖液)を用いて泳動したところ、より鮮明なバンドとしてとらえられることができた。このことから、広範囲のpHで泳動を行う場合にも広範囲の両性担体に狭い範囲の両性担体を混ぜた両性担体液を使用するほうが望ましいことが分かった。
 5) イムノプロットング法:従来は泳動後のセア膜を5%スルホサリチル酸で固定した後、イムノプロットング法を行っていた。確かに特定タンパクを鮮明にとらえることができたが、他のタンパクも固定するためか非特異的なバンドが出現する場合もあった。そこで、再びスルホサリチル酸の固定の有無を検討したところ、前処理したPVD F膜を直接密着させるだけで十分なことが分かった。但しセア膜とPVD F膜を密着させたときに膜の間にある余分な緩衝液を十分に取っておく必要がある。

1) 戸田 年総 他:生物物理化学, 31, 435, 1987.

2) 芝 紀代子 他:生物物理化学, 32, 55, 1988.

3) 長 裕子 他:生物物理化学, 34, 13, 1990.