

.....<特集> 等電点電気泳動 (III)

セルロースアセテート膜二次元電気泳動

(財)東京都老人総合研究所 生化学部

戸田 年総, 藤田 敬子, 大橋 望彦

はじめに

等電点電気泳動を利用した分析技術のひとつに、二次元電気泳動法 (Two-dimensional electrophoresis)^{1)~3)} がある。O'Farrell 法⁴⁾ に代表されるポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動法は、極めて分解能が高い優れた方法であるにもかかわらず、臨床検査法としては、まだほとんど利用されていないのが現状である。その理由としては、(1)ポリアクリルアミドゲルを支持体とすることに起因する、操作上の問題、(ゲルの調製や取扱いが面倒)、(2)結果が得られるまでに要する時間の問題、(通常、数日~1週間を要する)、(3)酵素などの生物活性を測定することが難しい、(SDS や尿素で蛋白質を変性させている)、(4)二次元パターンの解析法の問題、(各スポットの、簡便な定量法がまだない) といった問題点があげられる。私達の研究室で開発されたセルロースアセテート膜二次元電気泳動 (cellulose acetate two-dimensional electrophoresis)⁵⁾⁶⁾ は、こ

れらの問題点のうち(1)~(3)を解決する目的で考案された方法である。ここでは、その原理の概要と装置、操作法、およびヒトの組織抽出蛋白質、血清蛋白質の二次元パターンを示し、今後の問題点と将来の展望について述べたい。

1. 原理

1-1 セルロースアセテート膜二次元電気泳動とは

帯状セルロースアセテート膜上に塗布された蛋白質を、一旦、電氣的に濃縮した後、電気泳動によって一方向 (第一次元目の方向) に分離し、続いて、その膜を別のシート状セルロースアセテート膜に重ねて、第一次元目とは直角の方向 (第二次元目の方向) に泳動分離する手技である (図1)。本法の場合、第一次元目においてセルロースアセテート膜濃縮電気泳動 (cellulose acetate concentrating electrophoresis)⁷⁾、第二次元目においてセルロースアセテート膜等電点電気泳動 (cellulose acetate isoelectric focusing) を行っている。セルロースアセテート膜を支持体にした場合、分子篩 (molecular sieve) 効果による分離 (つまり、分子サイズおよび分子形に基づく分離) を期待することはできない。したがって、いずれの次元においても、蛋白質の電氣的性質に基づいた分離が行われる。

Two-Dimensional Electrophoresis on Cellulose Acetate Membrane

TOSIFUSA TODA, TOSHIKO FUJITA and MOCHIIHIKO OHASHI

Department of Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

(財)東京都老人総合研究所 生化学部

(〒173 東京都板橋区栄町35-2)

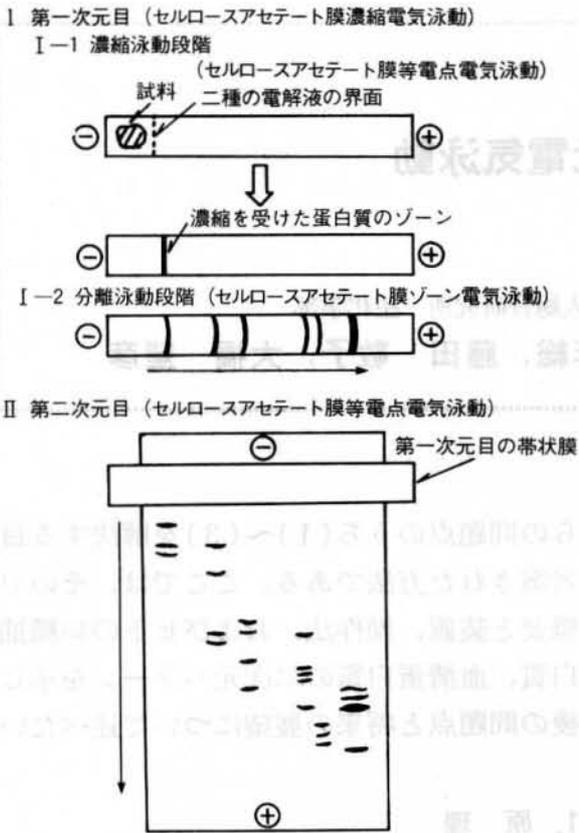


図 1

1-2 セルロースアセテート膜濃縮電気泳動における濃縮現象

本法の特徴のひとつは、第一次元目の分離に先立って、セルロースアセテート膜上で、蛋白質が濃縮される点にある。このため、蛋白質の濃度が低い試料でも、直接膜上に塗布することができる。しかも、濃縮後はシャープな一本のバンドとなるので、塗布の状態は、分離結果に何ら影響を与えない。セルロースアセテート膜濃縮電気泳動は、ディスク電気泳動 (disc electrophoresis)⁸⁾⁹⁾によく似ており、濃縮段階と分離段階から成っている。ただし、ディスク電気泳動の場合には、濃縮段階から分離段階へ自動的に移行するが、本濃縮電気泳動の場合、陰極側の緩衝液を交換しない限り、濃縮状態が維持される。この性質は、尿のように蛋白質濃度が極めて低く、多量 (0.5~1ml) の試料液を塗布しなければならない場合に、特に有効である。しかも、多少の電解質が共存していても、

蛋白質の濃縮には影響が見られない。セルロースアセテート膜濃縮電気泳動における濃縮現象は、基本的には、等速電気泳動 (isotachopheresis)¹⁰⁾¹¹⁾の原理に基づいている。以下、セルロースアセテート膜上で、蛋白質が濃縮を受ける様子を簡単に述べる。

支持体としての帯状セルロースアセテート膜、陽極槽、および、架橋濾紙には、 Tris^+ と Cl^- から成る先導液 (leading electrolyte) を、蓋の裏側の架橋濾紙、陰極槽、および、槽内の濾紙には、 Ba^{2+} と $\text{Arg}^{\delta-}$ から成る終局液 (terminating electrolyte) を配置し、最初は両液が混合しない様に、蓋は幾分持ち上げられた状態にしておく (図 2 A)。電極間に電圧を加えた後、膜と濾紙を接触させると、 Cl^- イオンと $\text{Arg}^{\delta-}$ イオンの作る境界線は、電気的に保持される (図 2 B)。これは、 Cl^- イオンの移動度が、 $\text{Arg}^{\delta-}$ の移動度より大きいので、移動度の差によって、両イオンの混合が防がれている。このとき、境界線の陰極側に試料液を滴下すると、そこに含まれる蛋白質の大部分は Cl^- と $\text{Arg}^{\delta-}$ の中間の移動度を有するので、両イオン層の間に挟まれて濃縮を受ける。そして、支持体に電気浸透 (electroendosmosis)

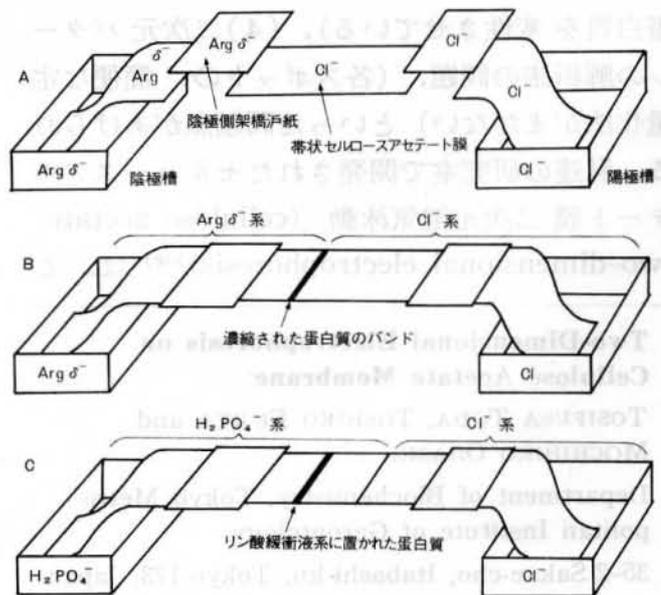


図 2

がなく、また、定電流の条件で泳動を行った場合には、各イオンの境界線は一定の速度で陽極方向に移動を続ける。この状態が、厳密な意味での等速電気泳動である。しかし、多量の試料を長時間にわたって、断続的に滴下し続ける場合、境界線が動いてしまうのは不都合である。そこで、この様な場合、私達は、あえて電気浸透の強いセルロースアセテート膜（例えば、セパラックス）を用い、陰極方向への液体の流れ（cathodic drift）を積極的に利用することによって、境界線の移動を打ち消している。

1-3 濃縮段階から分離段階への移行

蛋白質が十分に濃縮を受け、シャープなバンドを形成した後、陰極槽と陰極側の架橋濾紙を交換することによって、終局液を、 Tris^+ と H_2PO_4^- から成る追越液（passing electrolyte）に置き換える。 H_2PO_4^- イオンの移動度は Arg^+ および濃縮された蛋白質イオンの移動度より大きく、 Cl^- イオンの移動度より小さいので、 Arg^+ 層と蛋白質層を追越して Cl^- 層との間に境界線を形成し、陽極側に進み去る。その結果、蛋白質は、 Tris^- リン酸緩衝液系の中に残され、通常のゾーン電気泳動と同じ状態になる（図2C）。

1-4 セルロースアセテート膜等電点電気泳動

これは、セルロースアセテート膜を支持体とし、その上で両性担体（carrier-ampholytes）による pH 勾配を形成させる、水平式の等電点電気泳動である。等電点電気泳動の原理は、基礎編で述べられているので、そちらにゆずり、ここでは、セルロースアセテート膜を支持体とする場合の特殊性について述べる。

等電点電気泳動においては、支持体の電気浸透が、安定な pH 勾配の形成を阻害する。したがって、電気浸透の全くない（あるいは、ほとんど無視できるほど低い）セルロースアセテート膜を選ぶ必要がある。しかも、強いアルカ

リ性の条件下では、セルロースアセテートのアセチル基が遊離されやすくなり、電気浸透の上昇をもたらす恐れがあるので、極端に高い pH に長時間さらされる事は避けなければならない。また、膜は極めて薄い（ $140\mu\text{m}$ ）ので、乾燥や結露の影響を受けやすい。したがって、泳動槽は、無駄な空間をできるだけ小さくし、蓋の気密を保つ必要がある。しかし、これらの特殊性は、装置と泳動条件の選択によって、十分補うことができる。逆に、セルロースアセテート膜を支持体とする等電点電気泳動の長所は、(1)ゲルの調製の必要がない、(2)短時間で結果が得られる（泳動に3時間、染色脱色に30分間）、(3)試料の少量で済む、(4)2~3枚重ねることができるので、蛋白質染色以外に、酵素活性の検出や、免疫化学的検出法（例えば免疫固定法や免疫電気向流法）を同時に実施することができる。

1-5 第一次元目と第二次元目における分離の違いについて

図3Aで模式的に示す様に、蛋白質は、それぞれ固有の pH-移動度曲線（各 pH における移動度をプロットしたもの）を有している。す

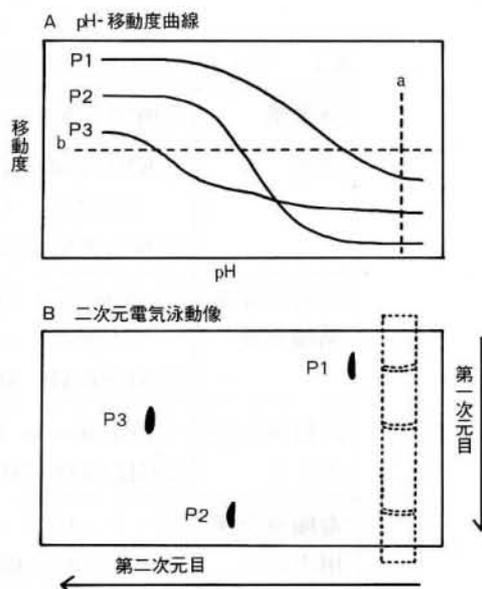


図 3

で述べた様に、第一次元目（濃縮電気泳動）では、蛋白質は一定の pH 条件の下で泳動分離される。つまり、図 3 A の縦線 a と各蛋白質の pH-移動度曲線の交点で与えられる移動度の順序に分離される。一方、第二次元目では、移動度が零となる pH、つまり、図 3 A の横線 b と pH-移動度曲線の交点で与えられる pH の順序に分離される。したがって、この例の 3 種類の蛋白質 (P₁, P₂, P₃) 混合試料液を本法で展開すると、図 3 B の二次元パターンが得られる。

2. 装置

2-1 濃縮電気泳動槽

セルロースアセテート膜上に形成された Cl⁻ イオンと Arg⁰⁺ イオンの境界線は、電圧が加えられていれば安定に保たれるが、電圧を除くと、各イオンは急速に拡散し、明瞭な境界線が消失する。この状態でしばらく放置された場合、再び電圧を加えても、安定な平衡状態をとり戻すには、かなり長時間を要し、しかも、再び得られた境界線には乱れを生じることが多い。図 4 A に示す濃縮電気泳動槽は、私達の研究室で開発されたもので、電圧を加えたまま、

4 枚の帯状セルロースアセチート膜を同時に、汙紙架橋と断続できるように作られている。現在この装置は、後述の等電点電気泳動槽と共に(株)常光から市販されている。

2-2 等電点電気泳動槽

セルロースアセテート膜を用いて等電点電気泳動を行う場合、基本的には、水平式の電気泳動槽があれば良いが、膜の場合には、上述のように、ゲルとは異なるいくつかの特殊性がある。したがって、良好な結果を常に再現的に得るには、膜に適した装置を用いるのが望ましい。私達が使用している装置(図 4 B)は、蓋を閉じた時の槽内の空間が小さく、また、直線性の保持と、発生する気泡の影響を除去するため、電極は刃先状の形状になっている。

2-3 その他の装置

電源は、普通の定電圧定電流電源装置が利用される。しかし、設定電圧に到達した時点で、定電流から定電圧に自動的に切り換わるプログラム式電源があれば便利である(詳しくは後述)。泳動槽の冷却は、単に氷水を循環させるだけでも代用できる。試料連続滴下用ポンプには、低流速(毎時 0.2~0.4ml)で正確に送れ

表 1 セルロースアセテート膜二次元電気泳動に使用される装置

泳動槽	①(株)常光製セルロースアセテート膜二次元電気泳動装置
電源	①KPI 定電流定電圧自動移行電源 Model 2000-200-Auto (代理店 オリオン理研) ②(株)常光製定電圧定電流定電力電源 PVA-2000S
恒温冷却水循環装置	①(冷却部) NESLAB U-Cool, (温調部) TAMSON TC-3 (代理店 エムエス機器) ②NESLAB Model RTE-9 (代理店 エムエス機器)
試料滴下用ポンプ	①Pharmacia P-3 (代理店 ファルマシア・ジャパン) ②GILSON HP 16/R (代理店 エムエス機器)
電極液交換用ポンプ	①ミツミ科学(現アトー科学機器)製ペリスタポンプ SJ-1200 ②アトー科学機器製ペリスタミニポンプ SJ-1220
注)	①は当研究室で使用している装置

表2 操作法の選択規準および操作法の概略

蛋白質濃度	5 mg / ml 以上		5 mg / ml 未満	
塩含有量 (NaCl換算)	1 μ mol 未満	1 μ mol 以上	10 μ mol 未満	10 μ mol 以上
試料例	血清、涙液 組織抽出液	唾 液		汗、尿
操作法	I	II		III
	↓		↓	
			脱 塩	
	セパラックス膜上で予備濃縮			
	タイタンIII膜上で本濃縮			
	タイタンIII膜上で第一次元目の泳動分離			
	セパラックスEF膜上で第二次元目の等電点分離			

るものが必要である。電極液交換用のポンプは、普通のしごき型送液ポンプ(peristaltic pump)であれば良く、もし、手もとに適当なポンプがない場合には、注射筒を用いて、手動で行っても問題ない。私達が使用している装置と代用装置を表1に示す。

3. 操作法

3-1 セルロースアセテート膜濃縮電気泳動

一般に、電気泳動における移動度は、緩衝液系の電気伝導度や、pH に影響されるので、試料の塗布量や、電解質の含有量が多い場合、パターンが変化したり、分離能が低下する。本法では、濃縮泳動時に、ある程度の脱塩もなれさるので、試料中の蛋白質濃度と塩の含有量によって、最適操作法を選択すれば、血清から尿にいたる、どの様な試料液でも、一様に良好な分離パターンを得ることができる。

表2に選択の基準と操作法の概略を示す。各操作法間で異なるのは、脱塩段階と濃縮段階のみで、第一次元目の分離段階、および、第二次元目は共通の操作となる。透析尿の様に、多量の塗布を必要とする場合、タイタンIII膜上に直

接塗布することは難かしく、電気浸透のより強い、セパラックスが適している。しかし、続いて実施する第一次元目の分離泳動においては、タイタンIII膜の方が、分離能において優れているので、結局、一旦セパラックス膜上で予備濃縮した蛋白質を、さらにタイタンIII膜上に移し、第一次元目の分離を行っている。以下、最も操作段数の多い尿の場合(操作法III)を例にとって説明する。

脱塩—新鮮尿約 2ml を透析チューブにつめ、氷冷した 25mM アルギニン—塩酸緩衝液(pH 8.5) 約 1l に対して一夜透析。

予備濃縮—①セパラックス膜(80×10mm)の長辺縁に、指先でシリコングリースを微量塗り、ティシュペーパーに挟んで、余分のグリースを除いた後、先導液(表3)にひたして、約10分間平衡化する。②この平衡化の間に、陽極槽に先導液、陰極槽に終局液(表3)を入れ、槽中央の支持板に沓紙をかぶせる。さらに、蓋の裏側に設置された2枚の緩衝液架橋板(suspension bridge)のうち、陽極側には先導液を含む沓紙、陰極側には終局液を含む沓紙を置き、乾いた沓紙で軽くふき取っておく。③次に、①で平衡化された膜を、ガラス板(80×

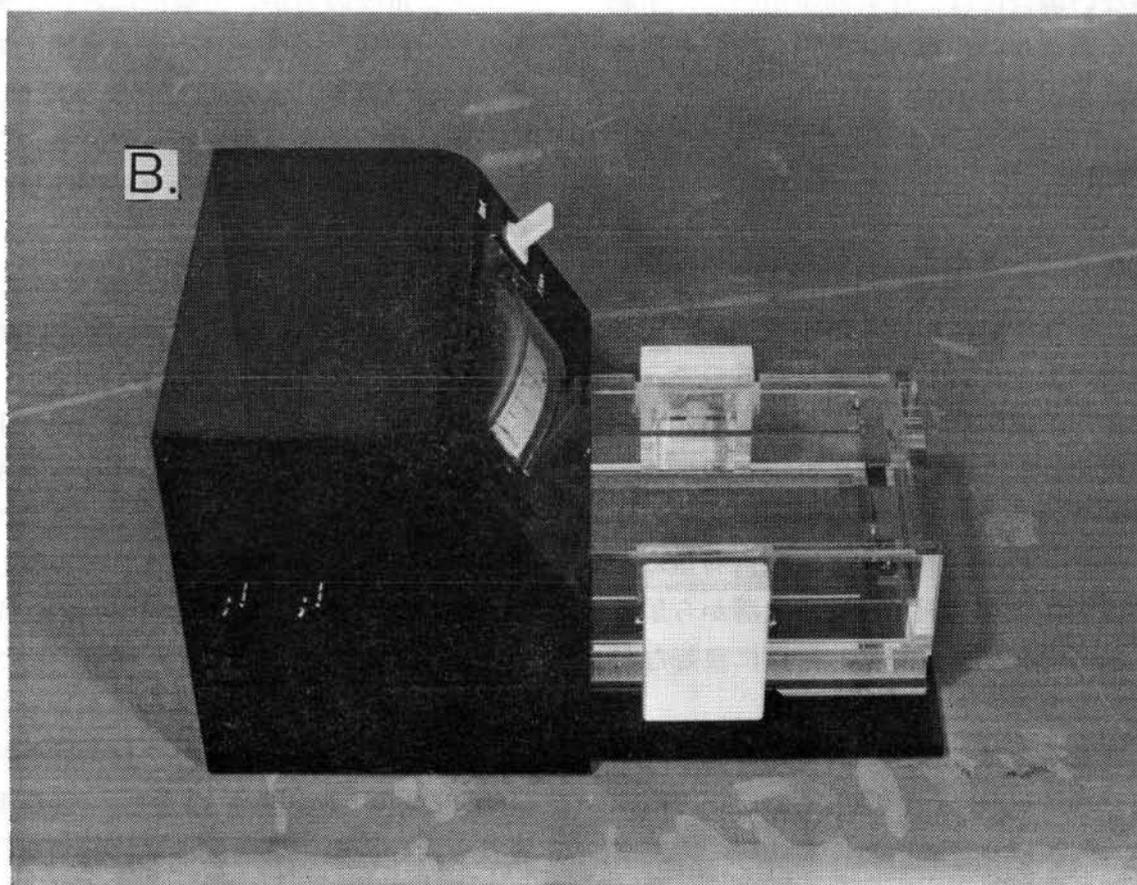
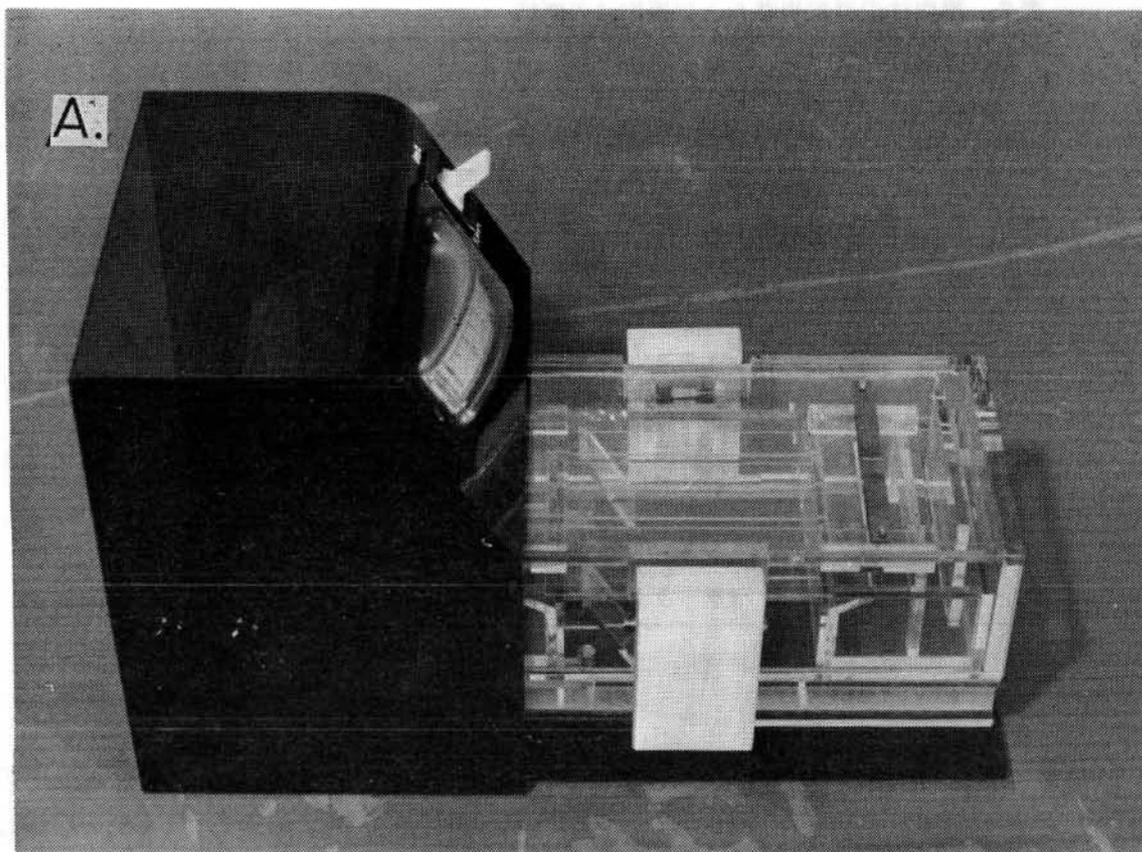


図 4

表3 セルロースアセテート膜二次元電気泳動に使用される電解液

第一次元目	
先導液	62mM Tris - 塩酸(pH 6.7)
終局液	50mM アルギニン-水酸化バリウム(pH 11.7)
追越液	100mM Tris - リン酸(pH 7.5)
第二次元目	
両性担体液	5% アンホライン(pH 3.5-10), 10% 蔗糖混合溶液
陽極液	1% リン酸, 30% 蔗糖混合溶液
陰極液	1% エチレンジアミン溶液

60×2mm) の上に置く。(同時に4枚の帯状膜を平行にのせられる。) 陰極端をそろえ, 余分の先導液を沓紙で吸い取り, 図4Aの濃縮電気泳動槽内の冷却台にのせる。④蓋を中段まで閉じ, 電極間に定電圧200Vを加える。⑤蓋を完全に閉じることによって, 膜と架橋沓紙, および, 電極液を連結させる。膜と沓紙の接触によって通電が開始され, 同時に, 先導液と終局液の境界線が形成される。⑥約5分間, 予備通電を行った後, 微量ポンプ(定速低流量しごきポンプ)を用いて, 蓋の穴から断続的に試料液を滴下する。この時の電流値の変化を記録し, 図5の様に, 一定の“鋸波形”が維持されるように, 流速を調節する。⑦試料の滴下を行っている間に, ポンプまたは注射筒をつないだポリエチレンチューブを, 蓋の穴から電極槽の中に挿入し, ポンプでなら連続的に, 注射筒の場合には約20分毎に半量ずつ, 新鮮な電極液と交換する。⑧試料滴下終了後, 0.1%ブロムフェノールブルー水溶液約1 μ lを滴下し, さらに15~30分間通電する。

タイタンIII膜上での本濃縮— ①上述のセパラックスと同様に処理されたタイタンIII膜(76×10mm)を濃縮電気泳動槽内に設置し, 両電極槽および架橋沓紙は, 新鮮な緩衝液を含むものと交換する。②先の予備濃縮で得た蛋白質の濃縮層部分を切り取る(ブロムフェノールブルーの青色部分を中心に約1cm幅を切断)。③200Vで約5分間予備通電を行った後, この膜

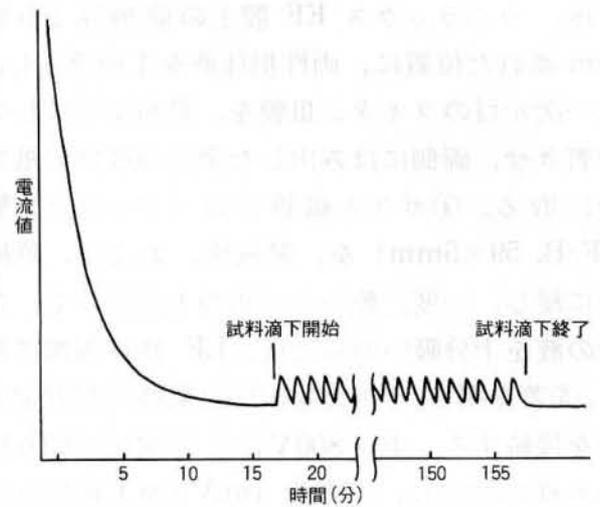


図 5

切片をタイタンIII膜の陰極端に置き, 定電圧200Vで濃縮を行う。約10分後に膜切片を除去し, さらに5分間通電する。操作法Iの場合には, この段階から出発し, 試料とブロムフェノールブルーは, 蓋の穴から直接タイタンIII膜上に滴下する。

第一次元目の泳動分離— ①本濃縮終了後, 一旦蓋を外し, タイタンIII膜はそのままで, 電極槽と架橋沓紙を, それぞれ次のものと置き換える。新鮮な先導液を含む陽極槽と陽極側架橋沓紙。追越液(表3)を含む陰極槽と陰極側架橋沓紙。②帯状タイタンIII膜1本当たり0.4mAの定電流で約50分間泳動する。

3-2 セルロースアセテート膜等電点電気泳動

第一次元目の泳動分離中に、次の①および②を実施する。①セパラックス EF 膜 (110×60 mm) を両性担体液 (表 3) 中に 2~5 分間浸し、ガラス板 (120×80×3mm) の中央にのせる (同一試料のコピーを複数枚必要とするときには、必要な枚数の膜を 1 枚のガラス板上に重ねておく。) ②沔紙で余分の液を吸い取り、乾燥を防ぐために、等電点電気泳動槽内に入れ、蓋を閉じておく。③第一次元目の泳動分離終了後、セパラックス EF 膜上の陰極端より約 1cm 離れた位置に、両性担体液を 1 滴落とし、第一次元目のタイタン III 膜を、膜面を下にして密着させ、両側にはみ出した余分の液は沔紙で吸い取る。④ガラス繊維沔紙 (ワットマン製 GF/B, 59×5mm) を、陽極液、および、陰極液に浸し、一度、乾いた沔紙の上に置いて、余分の液を十分吸い取った後、EF 膜の両端に置く。⑤蓋を閉じ、定電流定電圧自動移行型安定電源を接続する。電圧 800V にて定電圧に切り換わる様に設定し、定電流 1mA (膜 1 枚当り) で通電を開始する。⑥約 1 時間で定電圧に切り換わるのでその直後、タイタン III 膜を除去し、さらに約 2 時間 (通算で 3 時間) 等電点電気泳動を行う。普通の定電流定電圧電源を用いた場合、はじめ 300V で 60 分間、ついで 500V で 60 分間通電した後、タイタン III 膜を除去し、さらに 800V で 90 分間通電すると良好な結果が得られる。

3-3 蛋白質染色、膜の乾燥・保存

蛋白質染色は、固定、染色、脱染色の過程で行う。

固定— 第二次元目の等電点電気泳動終了後 EF 膜を 20% スルホサリチル酸溶液に約 10 分間浸し、蛋白質を固定する。

染色— ① A 液 (6.4% スルホサリチル酸, 10% トリクロル酢酸混合溶液), B 液 (0.12% クマジーブリリアントブルー G250 の 99.5% エタノール溶液) の 2 液を調整しておく。②使用

直前に、A 液 1 容に B 液 1 容を混合し、その中に EF 膜を浸す。染色時間は 6 分が最適である。染料によっては EF 膜自体に親和性があるため、染色時間が長過ぎると、後述の脱染色が非常に悪くなる。最近、Serva 社 (代理店: 丸善石油) から市販された Serva Violet 49 は、EF 膜への親和性が低く、10 分以上染色液に浸しても、10 分以内で脱染色される。

脱染色— ① 20% エタノール, 10% 酢酸混合溶液 (用時調製) 中に、EF 膜を移す。② 時々液を攪拌し、また、適宜液を交換しながら約 30~40 分間脱染色を行う。なお、アルコール濃度を上げると脱染色は速くなるが、染色されていた蛋白質のスポットまで脱色されてしまうので、20% が最適濃度である。

乾燥・保存— EF 膜を 1~2 分間水洗後、乾燥液 (5% 酢酸, 7.5% クリセロール, 2% ポリビニルアルコール混合溶液) 中に約 15 分浸す。② 膜をガラス板にのせ、余分の液をティッシュペーパーで吸い取って、室温下一夜、または、温風下 30 分乾燥する。③ ガラス板から静かにはがし、写真用透明ビニル袋等に入れて保存する。

4. 本法による蛋白質の二次元パターン

4-1 組織抽出液中の蛋白質の二次元パターン

組織タンパク質の組成分析は、各種生検 (biopsy) の際に、組織病理学的検査と並行して行われる場合がある。従来の一次的セルロースアセテート膜電気泳動では、アイソザイムの検索等が主で、蛋白質の解析には困難な点が多い。この様な場合、本二次元電気泳動法の利用は有効であろう。図 6 にヒト骨格筋 (A), 横隔膜 (B), 大脳 (C), および骨髄 (D) の組織抽出液中の蛋白質の二次元パターンを示す。それぞれに特徴的なパターンを示しているが、組織学的に近縁の骨格筋と横隔膜では類似性が高い。

図 7 は癌死亡患者例における、正常組織、および、腫瘍部位組織蛋白質の二次元パターンを

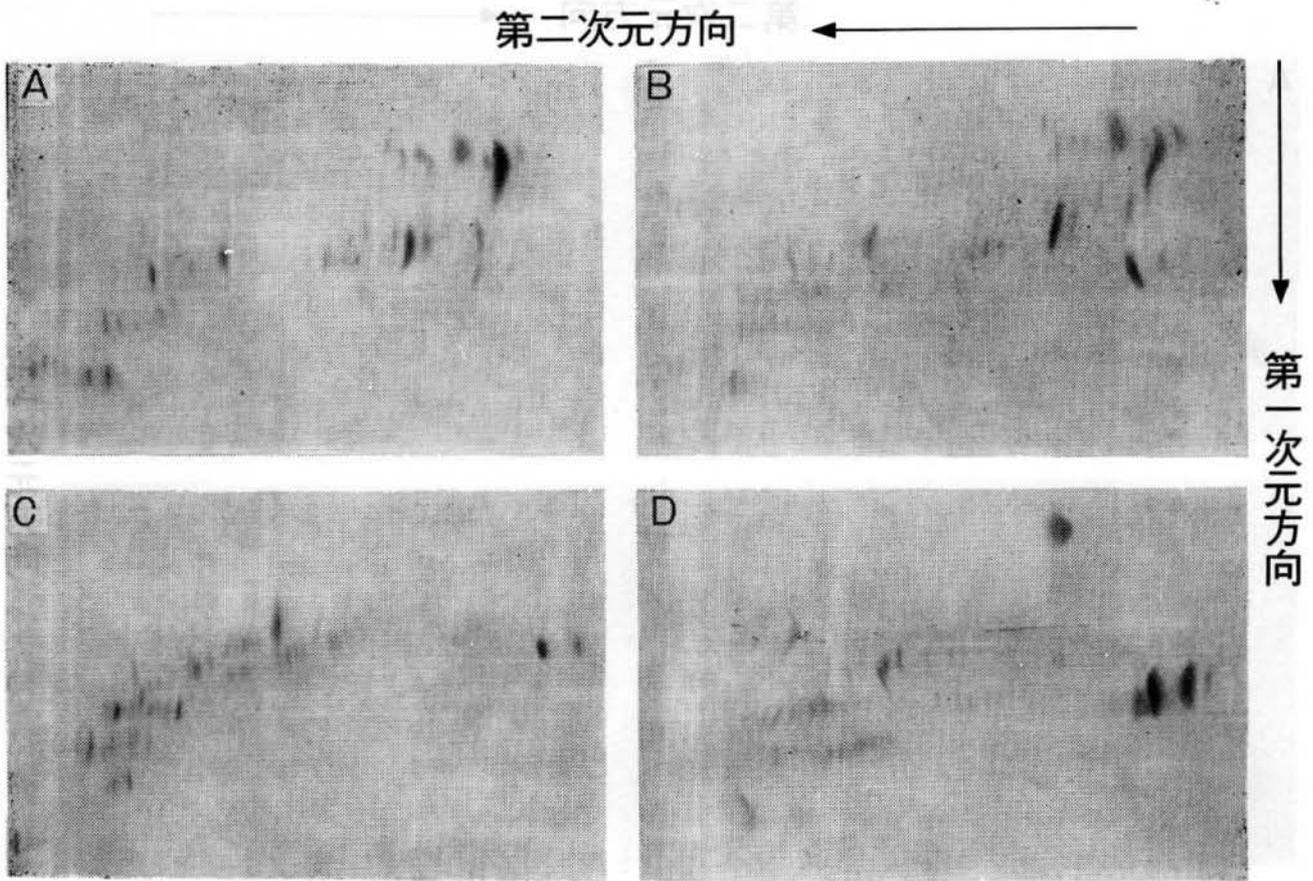


図6 ヒトの各種組織抽出液中の蛋白質の二次元パターン
A. 骨格筋, B. 横隔膜, C. 大脳, D. 骨髄

示す。生前、レントゲン検査等による臨床診断にて、食道に腫瘍巣を確認、死後剖検にて、肺に原発と見られる腫瘍巣を認め、食道へは浸潤であると診断された。各腫瘍部位組織を、出来る限り正常組織が混入しない様に切除し、その抽出液中の蛋白質の二次元パターンを比較検討した。二次元パターンの上では、食道部腫瘍組織(D)と正常食道組織(C)との間に類似性が高く、肺腫瘍組織(B)では同様に正常肺組織(A)との類似性が認められ、食道組織由来の原発性腫瘍と肺原発腫瘍の重複癌の可能性が示唆された(第37回日本癌学会総会発表)

4-2 血清蛋白質の二次元パターン

血清は、電気泳動法による臨床検査の検体として最も良く利用されて、その5分画パターンは、各種疾患の臨床診断指標として有効な手段となっている。本法でヒト血清蛋白質を展開す

ると、75スポット以上の解像度を示し、従来の一次的セルロースアセテート膜電気泳動に比べ、はるかに多くの情報を一度に得ることができる。

図8に、健常人の主要な血清蛋白質の、二次元パターン(分布図)を示す。これら各成分の同定は、免疫固定法(immunofixation)ならびに免疫電気向流法(electrosyneresis)によった。まだ例数は不十分であるが、癌患者血清において、IgG, IgA, Tf, α_1X 等に量的変化が認められている。

4-3 尿蛋白質の二次元パターン

尿は、患者に負担をかけずに採取できるので、魅力ある検体である。しかし、蛋白質に関しては、有効な分析手段が少ないため、血清に比して利用率が低いのが現状である。本法による二次元パターンは、血清や組織蛋白質との比

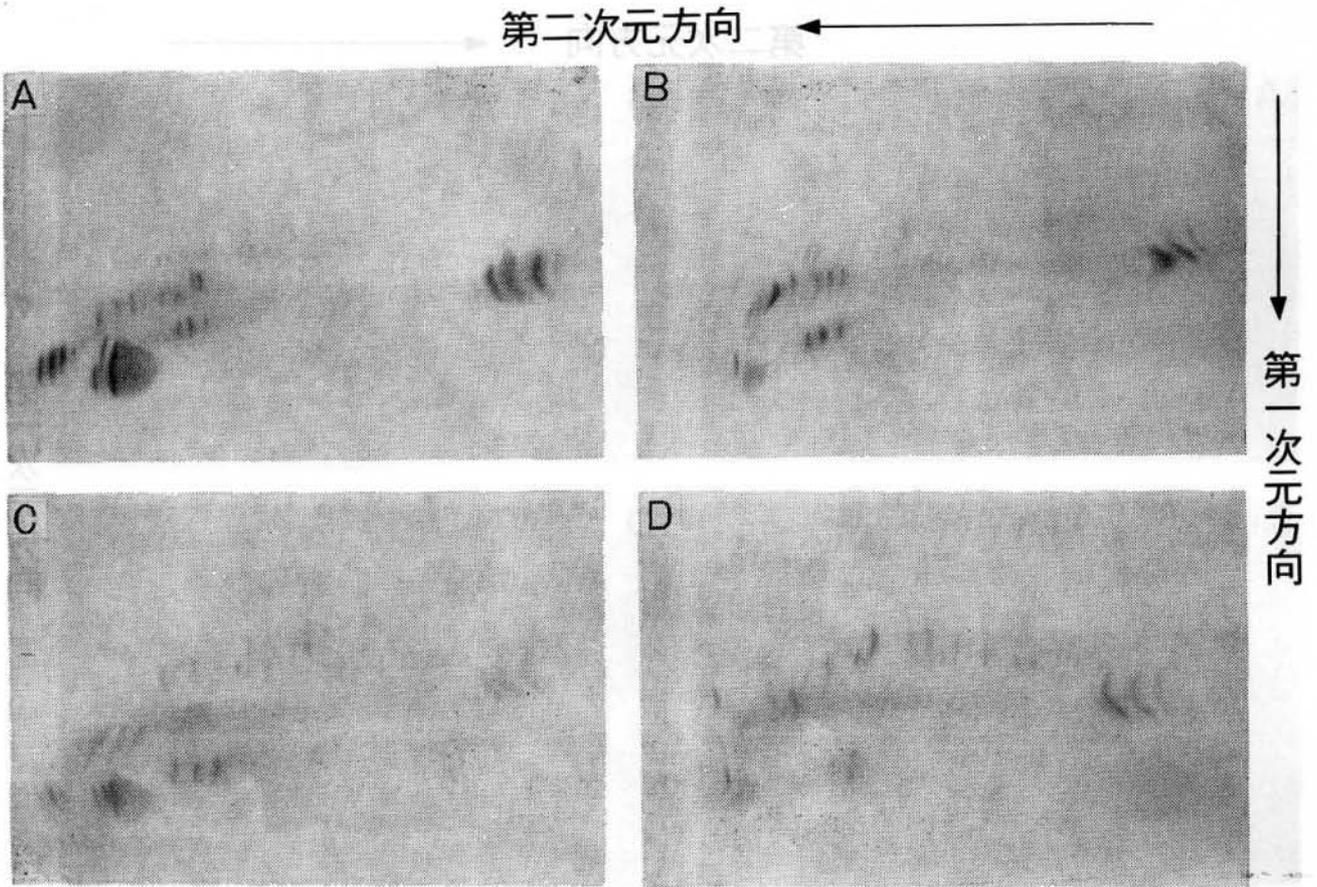


図7 ヒト正常組織および腫瘍部位組織抽出液中の蛋白質の二次元パターン
 A. 肺正常組織, B. 肺腫瘍組織, C. 食道正常組織, D. 食道腫瘍組織

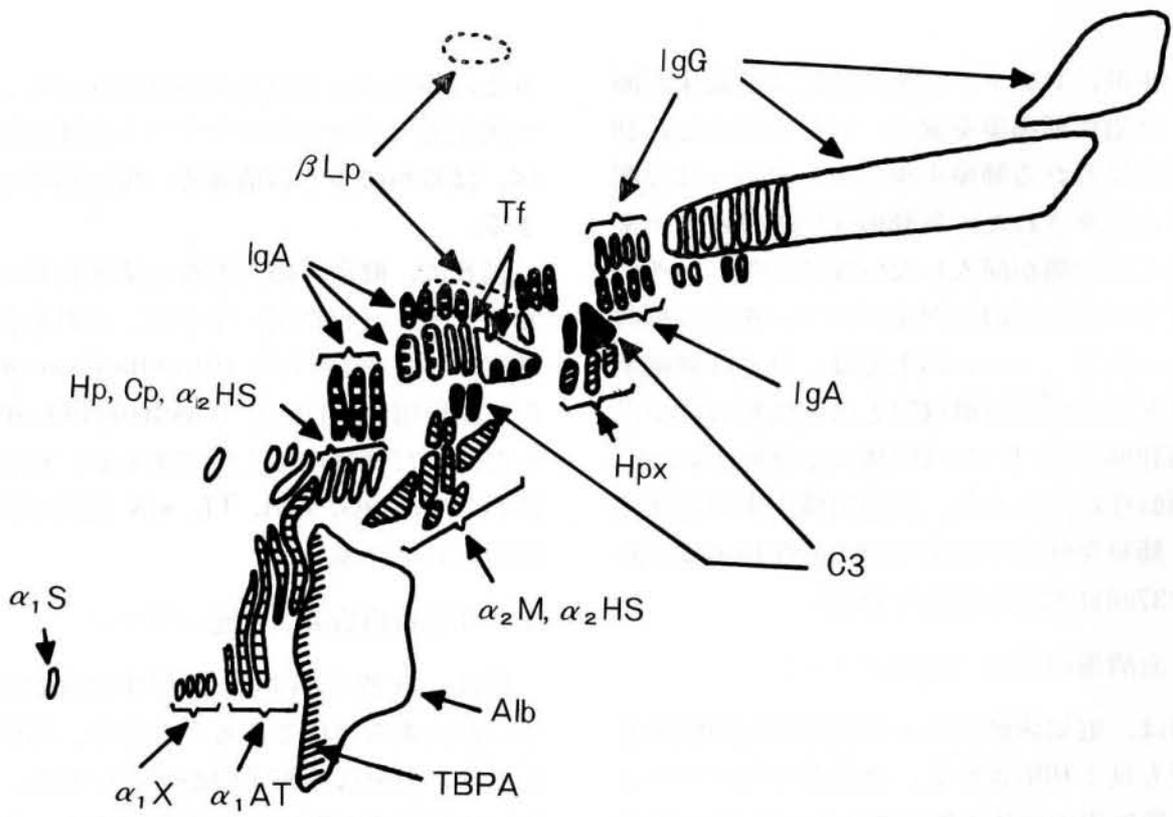


図8 ヒト血清蛋白質の二次元パターン

文 献

較が容易であり、解像度も高いので、従来注目されていなかった疾患例についても、尿検査適用の可能性が強くなった。胃癌患者例において、入院直後から、死亡直前まで、1週毎に尿蛋白質の二次元パターンを追跡し、病態の変化に伴うパターン上の変化を第38回日本癌学会総会に報告した。

5. 問題点と展望

本法は、非常に広い濃度範囲の蛋白質試料液から、短時間に、高い分解能で二次元パターンを得る手技であり、各種疾患例について、新しい知見を与えつつある。しかし、現在本法がかかえている最大の問題点は、本法で得られた二次元パターンの解析が、あくまでも肉眼的観察に依存しており、微小な量的変動の客観的評価が難しいことである。

最近、O'Farrell 法等のポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動に対して、コンピュータによる画像処理を利用した定量化の試みが報告され始めており、近い将来、本法も定量的解析が可能となると信じている。その時点で、本法の利用範囲も、さらに拡大するものと期待される。

- 1) D. L. Wilson, M. E. Hall, G. C. Stone and R. W. Rubin : *Anal. Biochem.*, **83**, 33 (1977)
- 2) N. L. Anderson and N. G. Anderson : *Anal. Biochem.*, **85**, 341 (1978)
- 3) J. Klose and M. Feller : *Electrophoresis*, **2**, 12 (1981)
- 4) P. H. O'Farrell : *J. Biol. Chem.*, **250**, 4007 (1975)
- 5) 戸田年総, 大橋望彦 : 生物物理化学 (The Physico-Chemical Biology) **22**, 43 (1978)
- 6) T. Toda, T. Fujita and M. Ohashi : *Anal. Biochem.*, in press
- 7) 戸田年総, 大橋望彦 : 生物物理化学 (The Physico-Chemical Biology) **23**, 42 (1979)
- 8) L. Ornstein : *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 321 (1964)
- 9) B. J. Davis : *Ann. New York Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
- 10) H. Haglund : *Sci. Tools*, **17**, 2 (1970)
- 11) 戸田年総, 長尾嘉信 : 別冊蛋白質核酸酵素, 等電点電気泳動と等速電気泳動, 共立出版 (東京), p. 126 (1978)