

小型2次元電気泳動装置の製作と血清タンパク分析への応用

根岸秀幸, 奥山典生, 加藤尚彦*¹, 中山 洋*²

神奈川県立大学 歯科生体工学教室

*¹横浜市立大学 医学部 生化学教室

*²東京都立大学 理学部 化学教室

1. はじめに

血清タンパク質、細胞タンパク質のような多数のタンパク質を含む試料を分析するために高分解能2次元電気泳動法が知られている¹⁾。この方法の多試料処理のための迅速-簡易化法として、40mm-スラブゲルを用いる方法を実用化し、脳細胞の可溶性タンパク質混合物などの分析に適用してきた。この方法は0.5~1 μ lの血清を120分前後で分析する方法で、とくに界面活性剤などのタンパク質変性剤を含まない方法は臨床化学的なZymograph的な分析には最適な方法であり、いろいろの複合タンパク質試料の分析に十分用いられることを報告して来た²⁾。これらの方法をさらに短時間で、さらに微量の試料について適用し、質量分析装置などによる分析なども考慮して20mm-スラブゲルを用いる方法を工夫した。本報においては、その装置の製作法と血清タンパク質の分析例について述べる。

2. 試薬調製および使用機器

2-1 試薬調製

各種保存溶液の調製に用いた試薬は、すべて市販の試薬特級または電気泳動用試薬を使用した。調製方法³⁾は、表1に示すとおりである。

2-2 使用機器

2-2-1 ペリスタポンプ

スラブゲルを調製する際に、小型スラブ

ゲル作製装置に上層液、アクリルアミドゲル溶液、下層液を送り込むためにペリスタポンプ (PERISTA MINI-PUMP SJ-1211, アトー株式会社) を使用した。

2-2-2 電気泳動用電源装置

電気泳動用電源装置には、アトー株式会社製品のV-C STABILIZER(SJ-1061)を使用した。

3. 小型2次元電気泳動装置の製作

3-1 キャピラリーゲル電気泳動装置の製作

厚さ1.5mmのアクリル板と5mmのアクリル板を用いて、図1に示すようなキャピラリーゲル電気泳動装置を作製した。

3-2 小型スラブゲル作製装置の製作

小型スラブゲル作製装置の外観を図2に、大体の設計図を図3に示した。厚さ3mmのアクリル板を用いて、図2に示す大きさに作製した。この装置では、ガラス製2枚組のスラブゲル作製用モールド (27 \times 27mm, 厚さ1mm, 図4) を8枚組分入れて、8枚の20mm-スラブゲルを作製することができる。

3-3 小型スラブゲル電気泳動装置の製作

厚さ3mmのアクリル板を用いて、図5に

表1 各種保存溶液の調製方法

0.23%TEMED溶液	N,N,N',N''-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED)0.23mlを水に溶かして100mlにする。 [4℃]
4%ゲル用アクリルアミド溶液	アクリルアミド32g, N,N''-メチレンビスアクリルアミド(Bis)1.6gを水に溶かして200mlにする。 [4℃]
0.1%過硫酸アンモニウム溶液	過硫酸アンモニウム10mgを水10mlに溶解する。(使用する前に調製する)
陽極槽液	1Mリン酸溶液8mlを水で希釈して800mlにする。(使用する前に調製する)
陰極槽液	水酸化ナトリウム0.4gを水250mlに溶解する。(使用する前に調製する)
ゲル用緩衝溶液	トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris)73.2g, 1M塩酸溶液96ml, TEMED0.46mlを水に溶かして200mlにする。 [室温]
17%ゲル用アクリルアミド溶液	アクリルアミド170g, Bis8.5g, ショ糖100gに水を加えて450mlにする。次に、60℃に加熱して溶解し、溶解後水を加えて500mlにする。 [室温]
0.2%過硫酸アンモニウム溶液	過硫酸アンモニウム20mgを水10mlに溶解する。(使用する前に調製する)
20%エタノール溶液	エタノール20mlを水で希釈して100mlにする。 [4℃]
60%ショ糖溶液	ショ糖60gと窒化ナトリウム50mgを水に溶かして100mlにする。 [4℃]
スラブゲル電気泳動用電極槽液	Tris1.2gとグリシン5.76gを水に溶かして200mlにする。
0.1%クーマシー染色液	クーマシーブリリアントブルー-R-250 1gをメタノール500mlに溶かして、氷酢酸70mlと水を加えて1lにする。 [室温]
7%酢酸溶液	氷酢酸140mlを水を加えて2lにする。 [室温]
20%メタノール-酢酸溶液	メタノール200mlと酢酸70mlに水を加えて1lにする。 [室温]
50%メタノール-酢酸溶液	メタノール500mlと酢酸70mlに水を加えて1lにする。 [室温]

[] 各溶液の保存条件

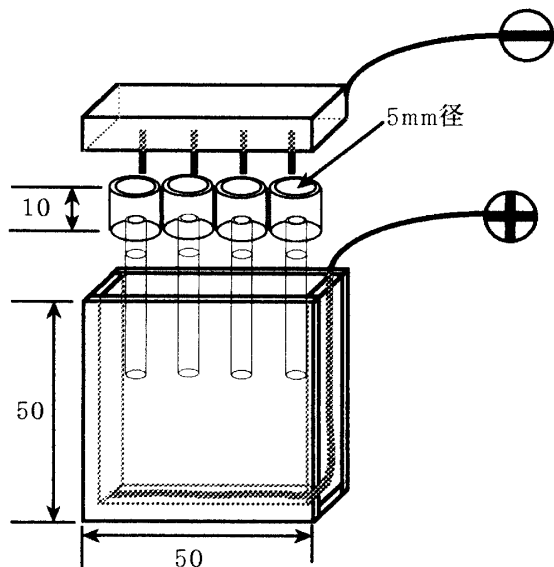


図1 キャピラリーゲル電気泳動装置 (単位mm)

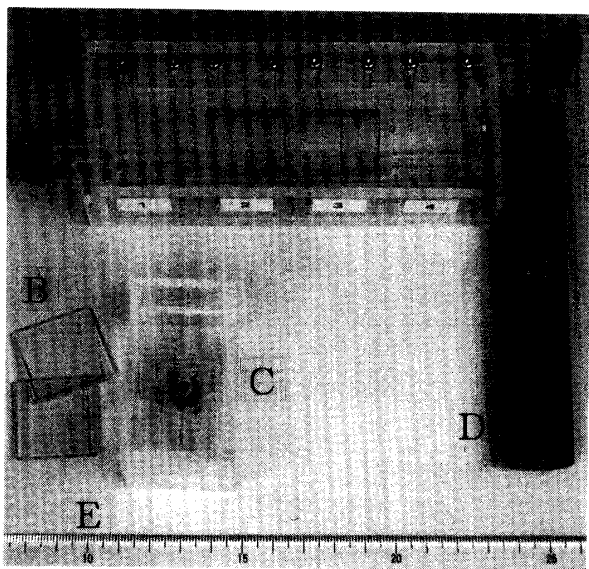


図2 小型スラブゲル作製装置と小型スラブゲル電気泳動装置の全体像
 A：小型スラブゲル電気泳動装置
 B：ガラス製のスラブゲル作製用モールド
 C：小型スラブゲル作製装置
 D：スラブゲル固定棒
 E：ものさし (cm)

示す大きさに作製した。この装置は、一度に4枚分のスラブゲル (27×27mm, 厚さ1mm) を後ろに傾けてで装着するように設計した。さらに、スラブゲル固定棒 (図6) でスラブゲルを固定するようになっている。

電極板は図7に示す構造と大きさとで、下部の電極板のみ電極槽液につける。上部の電極板にはとくに電極槽を作らず、スラブゲル上部の溶液を用いた。

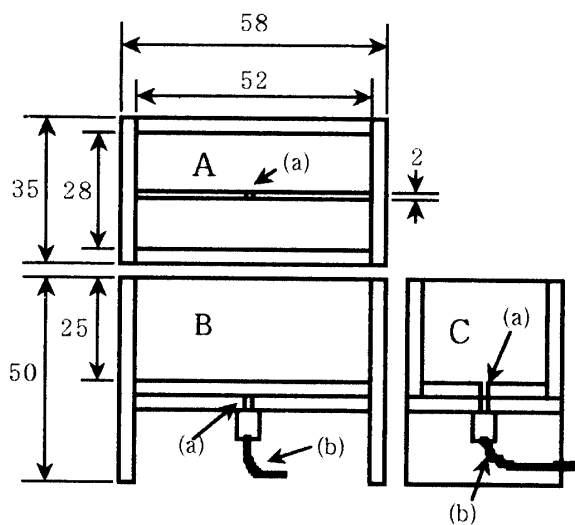


図3 小型スラブゲル作製装置の設計図 (単位mm)

A：上面図, B：正面図, C：側面図
 (a)：導入口, (b)：導管

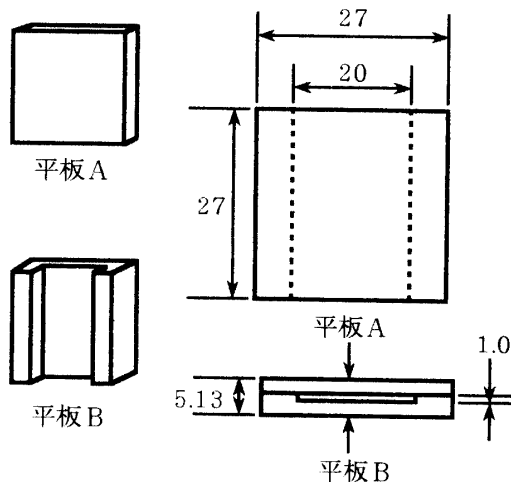


図4 ガラス製のスラブゲル作製モールド (単位mm)

電極板に配線したステンレス線は、電気泳動中に生ずる気泡の付着を防ぐために、市販のステンレス線（径0.28mm）を12Nの塩酸を入れたビーカーにつけ、さらにビーカーをホットプレートにのせ加熱して細くしたもの（径0.17~0.18mm）である。

3-4 染色・脱染色容器の製作

将来、この装置の自動化を考慮して、スチロール製の容器を使用して、4つのスラブゲルを同時に処理するよう図8のように改良したものをクーマシー染色・脱染色容器とした。

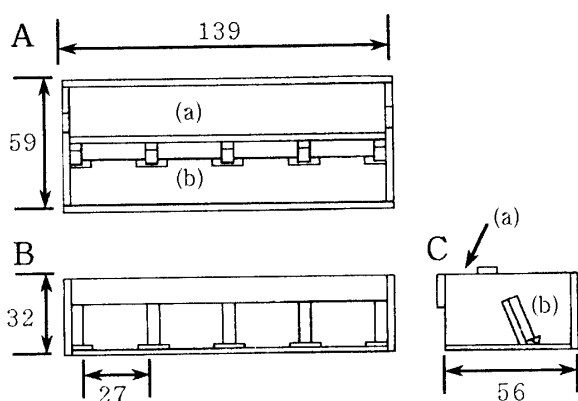


図5 小型スラブゲル電気泳動装置の設計図（単位mm）

A：上面図、B：前面図、C：側面図
(a)：上部電極板装着部位
(b)：下部電極液槽

3-5 等電点電気泳動用ゲル（キャピラリーゲル）の作製

等電点電気泳動用ゲル溶液は、氷浴中で表2に示す割合に各溶液を10mlのガラス製サンプル管に入れて（表の上から順に）混合した。混合後、サンプル管を氷浴中に入れた状態で、水流ポンプを使用して気泡が出なくなるまで脱気した（3分間）。真鍋ら³⁾の方法を次のように変更して長さ

20mmの等電点電気泳動用ゲル（径1.3mm、キャピラリーゲル）を作製した。40本のガラス製のキャピラリー（内径1.3mm、長さ42mm）を市販の亚克力製円筒容器（イムノメディカ株式会社）に入れて、輪ゴムでキャピラリーの上部を縛って束ねた。次に、束ねたキャピラリーを取り出した後、亚克力製の円筒容器に等電点電気泳動用ゲル溶液1.00mlを入れた。引き続き、気

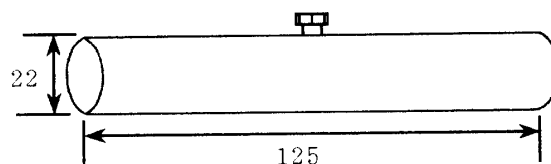


図6 小型スラブゲルの固定棒の設計図（単位mm）

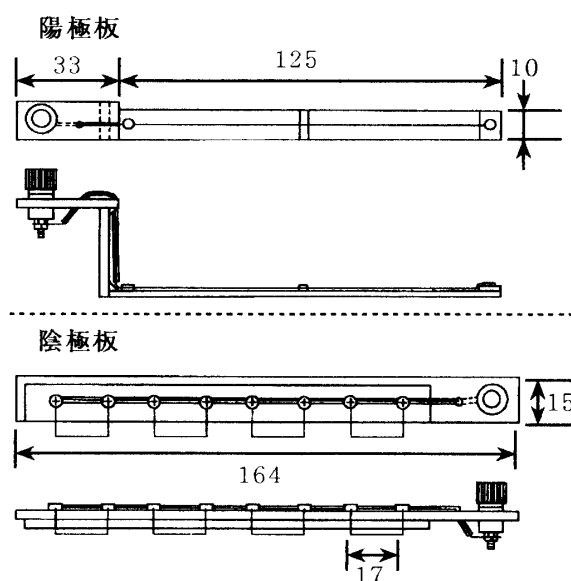


図7 小型スラブゲル電気泳動装置の電極板の設計図（単位mm）

泡ができないように静かに束ねたキャピラリーを落とし込み、さらにゲル溶液の高さが20mmになるまで注射器を使って、キャピラリーと円筒容器の間隙からゲル溶液を注入した。その後、30分間室温に放置して重合した。

密封できるガラス瓶に、蒸留水で湿らせたろ紙と共に調製したキャピラリーゲルを入れて、使用するまで冷蔵庫に保管した。

3-6 スラブゲルの作製と保存

5mlのガラス製のバイヤル3個を用意し、それぞれに表3に示した割合の上層液、アクリルアミドゲル溶液（6.4%）、下層液を調製した。調製後、各バイヤルは5分間氷冷した。引き続き、各バイヤルを真空デシケータに移して、2分間真空ポンプで各溶液を脱気した。

次に、8枚分のガラス製のスラブゲル作製用モールドとパラフィルムを交互にして小型スラブゲル作製装置に入れた。引き続き、図9に示すように、小型スラブゲル装置

にシリコンチューブ（外径3.0mm、内径1.5mm、長さ25cm）を付けた。その後、小型スラブゲル作製装置を氷浴に入れ、ペリスタポンプを使って0.38ml/minの流速で順に装置へ上層液1.51ml、アクリルアミドゲル溶液3.20ml、下層液1.01mlを送り込んだ（所要時間15分間）。すべての溶液を挿入したのち三方コックを閉じて、小型スラブゲル作製装置を30℃の恒温槽に浸けて2時間かけて重合した。

作製したスラブゲルはサランラップに包んで蒸留水で湿らせたろ紙と共に、ビニール袋に入れて使用するまで冷蔵庫に保管した。

表2 等電点電気泳動用ゲル溶液の調製

0.23% TEMED 溶液	0.50ml
4% ゲル用アクリルアミド溶液	1.00ml
水	0.25ml
アンフォライン溶液 (pH3.5~10) *	0.20ml
アンフォライン溶液 (pH3.5~10) *	0.05ml
0.1% 過硫酸アンモニウム溶液	2.00ml
	4.00ml

*2種類のアンフォライン溶液は、市販品の原液である。

表3 スラブゲル作製用溶液

上層液	
ゲル用緩衝液	0.19ml
0.2% 過硫酸アンモニウム溶液	0.33ml
20% エタノール溶液	0.99ml
	1.51ml
6.4% アクリルアミドゲル溶液	
ゲル用緩衝液	0.64ml
17% アクリルアミドゲル溶液	1.28ml
0.2% 過硫酸アンモニウム溶液	1.28ml
	3.20ml
下層液	
0.2% 過硫酸アンモニウム溶液	0.13ml
60% ショ糖溶液	1.01ml
	1.14ml

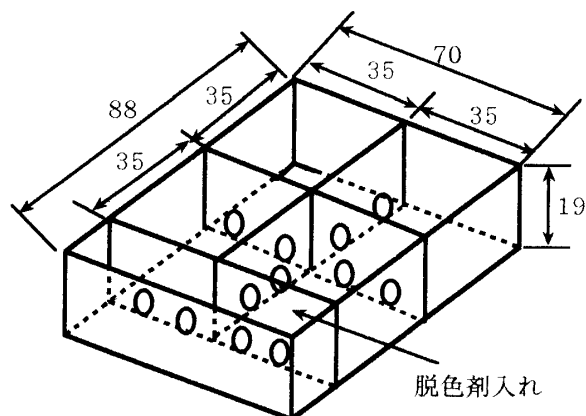


図8 クマシー染色・脱染色容器
(単位mm)

4. 血清タンパクの分析

4-1 試料の調製

ヒトの静脈血2.5mlを採取して遠心管に入れ、静脈血を凝固させたのち遠心機で血球と血清を分離した(3000rpm、15分間)。分離後、血清 $200\mu\text{l}$ を分取して、さらにシヨ糖 0.08g を添加したものを分析試料とした。

4-2 等電点電気泳動

等電点電気泳動装置は市販の40mm用の装置(イムノメディカ株式会社)を使用した。なお、使用した等電点電気泳動装置では、8本のキャピラリーゲルを同時に泳動できるが、今回は4本のキャピラリーゲルに分析試料を載せ、残りのキャピラリーゲルはダミーのゲルとした。

まず、キャピラリーゲルを陰極槽に取り付けて氷冷した陰極槽液(表1)を槽に満たし、さらにキャピラリーゲルの上部の気泡を除くために注射器でキャピラリーゲルの上部に陰極槽液を満したのち、あらかじめ氷冷した陽極槽液(表1)を入れた陽極槽に差し込んだ。次に、マイクロシリンジで分析試料(ヒトの血清) $1.0\mu\text{l}$ をキャピラリーゲルの真上に重層した。

ゲル1本当たり 0.1mA の定電流の条件で、電

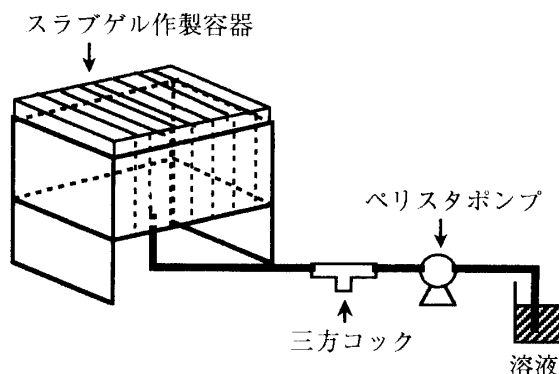


図9 スラブゲル作製の模式図

圧が 85V に達するまで泳動を行った(所要時間14分間)。次に、 150V の定電圧の条件で、電流値は 1.25mA から次第に減少し、20分間でほぼ一定(0.50mA)となったとき等電点電気泳動を終了した。

等電点電気泳動を終了したのち、ナイロン製のつり糸(50番)を加工したゲルの押し出し棒を用いて、キャピラリーゲルをキャピラリーから取り出した。

4-3 小型スラブゲル電気泳動

取り出したキャピラリーゲルは、直ちに氷冷したスラブゲル電気泳動用電極槽液(表1)を満したスラブゲルの上部に重層した。キャピラリーゲルを載せた4枚のスラブゲルを小型スラブゲル電気泳動装置(図5)に並べ、陽極板(図7)を陽極槽に入れてスラブゲル固定棒(図6)でスラブゲルを固定した。引き続き、氷冷したスラブゲル電気泳動用電極槽液を陽極槽に満した。

スラブゲルの上部に陰極板(図7)の電極を差し込んだ後、スラブゲル1枚当たり 5mA の電流を流して、30分間の泳動を行った。

4-4 クーマシー染色と脱色

真鍋ら³⁾の方法を一部変更して、クーマシーブルー染色と脱染色を行った。

泳動終了、ステンレス製のヘラを使ってガラス製のスラブゲル作製用モールドからスラブゲルを外し、0.1%クーマシーブルー溶液を入れたスチロール製の染色・脱染色容器（図8）に移し、容器を振とう機に置いて15分間振した。15分後、0.1%クーマシーブルー溶液を捨て、20%メタノール-酢酸溶液に交換して振とう機に置いて30分間振した。30分後溶液を捨て、再び20%メタノール-酢酸溶液を入れて30分間振した。バックグラウンドがほとんど無色になるまで、20%メタノール-酢酸溶液を使用して脱色を行った（60分間）。なお、脱色しにくい場合、50%メタノール-酢酸溶液を用いると脱色が促進される。脱色後、7%酢酸溶液に入れ換えてスラブゲルを保存した。

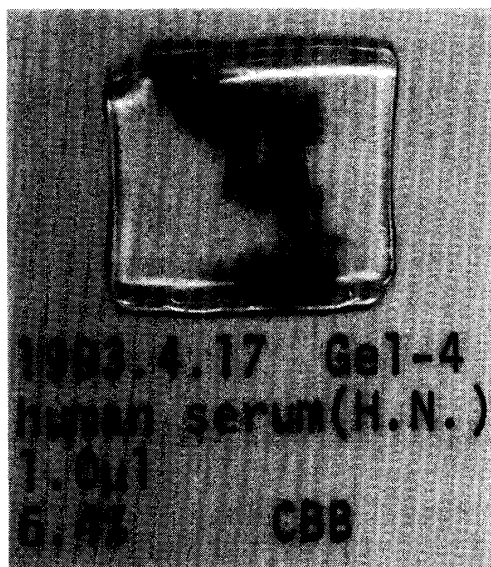
クーマシー染色・脱染色後のヒトの血清タンパク 2次元電気泳動像は図10に示した。

5. 考察と結論

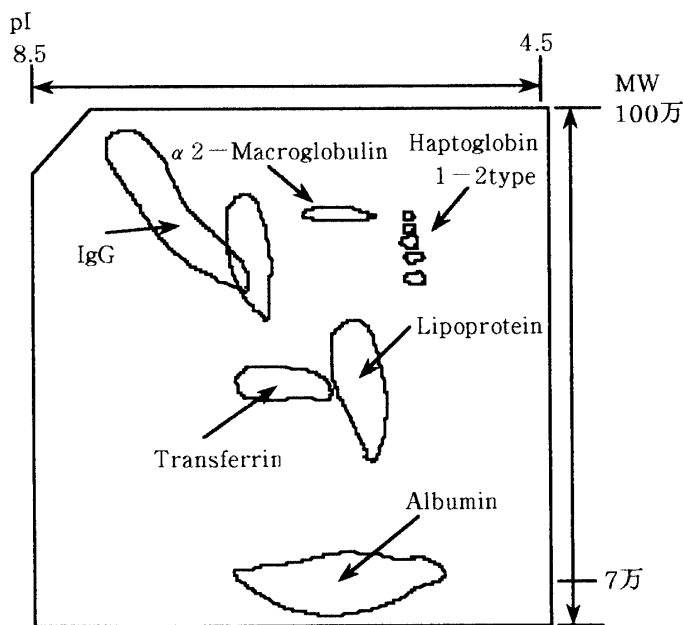
本実験においては、血清タンパクの分析方法の開発を目的とした、均一密度のゲルの作製のみを行った。6.4%のポリアクリルアミド系を採用し、ゲル作製の簡便化を目的として、脱気法などの条件について検討したが、特に簡略化については適当な方法の設定はできなかった。しかし、20mm×20mm×1mmのゲルの場合でも1次元、2次元、染色を含めて60~90分で操作も完了できる可能性が得られた。

標準の40mm×40mm×1mmの密度勾配ゲルの場合と比べて、操作時間は約1/2になり、試料量も約1/2で良好な結果が得られた（図10）。分離能の点では、とくに難点は見出せなかった。

染色試料は、タンパク質変性剤による処理を行わないで、そのまま溶液中に保存し



(上記の文字はタイプライターのゴチック文字である)



ヒト血清タンパク質のマップ

図10 ヒトの血清タンパクの2次元電気泳動像

20mm

た場合脱色され易いという欠点があるが、一方均一のゲルの場合には乾燥保存が可能である点が利点である。この乾燥ゲルは、そのまま35mm-projectorにかけることが可能である。

参考文献

- 1) N. G. Anderson and L. Anderson: Clin. Chem., 28(4), 732(1982).
- 2) T. Manabe, K. Kojima, S. Jitsukawa, T. Hoshino and T. Okuyama: Clin. Chem., 28(4), 824(1982).
- 3) 真鍋 敬：電気泳動法－基礎と実験, 169-210, (株)広川書店, 東京(1989).