An examination of separation conditions for proteins by agarose electrophoresis with Mupid-3

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9522

金大医保つるま保健学会誌 Vol. 31(2)
81～83　2007

Mupid-3を用いたアガロース電気泳動法による タンパク質の分離条件の検討

本間　啓子　　永島　幹子*　　櫻井　裕之**　　胡桃沢智子***　　馬渡　一浩

Key words
Electrophoresis, separation conditions, protein, Mupid-3, agarose gel

はじめに

タンパク質の電気泳動法は臨床検査で汎用される検査方法の一つである[1-2]。検査技術科学専攻では、電気泳動法の原理の理解や基本的な操作方法の習得を目的として、2年前期の生化学実習でセルロースアセテート膜電気泳動法を実習している。ところが近年、この実習が終了予定時刻になっても終わらないことが多くなってきた。ティーチングアシスタント（TA）と話し合ったところ、第1にセルロースアセテート膜が裂けやすい、第2に支持体へ緩衝液を浸透させるときにセルロースアセテート膜に気泡が入りやすい、第3に緩衝液を浸透させたセルロースアセテート膜はタンパク質が付着しやすいため直接素手で扱うことができない、第4にセルロースアセテート膜へのサンプルの塗布が難しい、第5にセルロースアセテート膜と泳動用緩衝液のブリッジに用いる濾紙のセットが難しいこと、これら5点が実習時間の長くなる要因であることが判明した。解決策についてTAから、DNAの電気泳動に汎用されている超小型電気泳動システムMupid-3[3]を使用すれば、支持体にアガロース[4-5]を用いることが可能となり、タンパク質の電気泳動が出来るのではないかとの提案があった。

Mupid-3は支持体にセルロースアセテート膜だけでなくアガロースゲルも選択できる。第1～第4の問題はセルロースアセテート膜を使用することに起因するもので、アガロールゲルを使用することで解決できるかもしれない。さらに、Mupid-3はアガロースゲルを泳動槽の緩衝液中に沈めて電気泳動を行うサブマリン方式で、濾紙のブリッジを必要としない。したがって、Mupid-3を用い支持体をアガロースゲルにすれば第1～第5の全部の問題を解決できると考えた。

そこで今回、Mupid-3を用いたアガロース電気泳動の条件について検討した。その結果、学生実習に導入可能な条件を見出したので報告する。

方　法

1．試　料

1）ヘモグロビン（Hb）溶液

ヒト赤血球を生理食塩水で3回洗浄後、上清の生理食塩水を除去した赤血球層0.1mlに蒸留水0.9mlを加え10～20分間放置後、10,000rpmで20分間遠心した。この上清部分をグリセロール（和光純薬, 特級）で2倍に希釈し、Hb溶液とした。

2）牛血清アルブミン（BSA）溶液

BSA（和光純薬，特級）2 gと塩化ナトリウム（和光純薬，特級）0.9gを蒸留水50mlに溶解し、そこにグリセロールを50ml添加し、2％ BSA溶液を調整した。2％ BSA溶液1 mlに0.1%ブロムフェノールブルー（BPB）エタノール溶液を0.2ml添加し、BSAにBPBを結合させた（BSA+BPB溶液）。

2．試　薬

1）ベロナール緩衝液（pH8.6）

ベロナール緩衝液の粉末（コスモ株式会社）1包をイオン強度0.06用は蒸留水500mlに、イオン強度

金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻
*　金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻博士後期課程
**　シゲタ動物薬品工業株式会社
*** 大洋薬品工業株式会社

0.04用は蒸留水750mlに溶解して調整した。

2）1.5%アガロースゲル

アガロースS（和光純薬）を50mlガラスビーカーに0.3g量り、20mlのベロナール緩衝液を加え、電子レンジで加温溶解後、1～2分放置した。ゲルメーカー台にゲルメーカー板（小：52×60mm）を置き、コームをセット後、加温溶解したアガロースSを流し込み固化させた。

3．電気泳動法

電気泳動は超小型電気泳動システムMupid-3（コスモバイオ株式会社）で行った。泳動槽にベロナール緩衝液（pH8.6）を300ml入れ、同じイオン強度で作成した1.5%アガロースゲル2枚をセットした。試料は分子量がほぼ同じで、等電点の異なるHb（分子量6.5万，等電点6.8）とBSA（分子量6.9万，等電点4.9）を用いた。BPBはアルブミンに結合して泳動されることが知られている[6]ので、泳動距離と泳動状況を観察するために予め混合して試料とした。Hb溶液は20 μl、BSA+BPB溶液は30 μlを塗布量とし、各々ウェルに注入し、50Vあるいは100Vの定電圧で電気泳動した。

結　　果

セルロースアセテート膜を用いるタンパク質の電気泳動は定電流（膜1cmあたり0.6～0.8mA）で45～60分間電気泳動する[1-2]。ところが、Mupid-3では50Vあるいは100Vの定電圧の電気泳動しか出来ない。また、泳動用緩衝液のイオン強度がタンパク質の泳動距離に大きな影響を与えることが知られている[7]。そこで、電圧（50V，100V）とイオン強度（0.04，0.06）を変えて電気泳動を行い、泳動距離を指標に泳動条件を調べた。

1．50Vの定電圧

イオン強度0.04のベロナール緩衝液を用いて50Vの定電圧でHbとBSAを60分間電気泳動した。図1に示すように、HbとBSAは電気泳動によって完全に分離され、泳動距離はHbで7.5±1mm、BSAで17.5±2mmであった。イオン強度が0.06の緩衝液を用いた場合もほぼ同じ結果であった。

2．100Vの定電圧

イオン強度0.04のベロナール緩衝液を用いて100Vの定電圧でHbとBSAを30分間電気泳動したところ、HbとBSAは完全に分離され、泳動距離はHbで7.5±1mm、BSAで17.5±2mmであった。イオン強度が0.06の緩衝液を用いた場合もほぼ同じ結果であった。

考　　察

1．電気泳動条件

今回実験したどの泳動条件でも、BSAの泳動距離の方がHbより長かった。BSAにBPBを結合させて用いても、BPBはBSAの分子内部の疎水性ポケットに結合するので、泳動に影響を与える表面荷電（等電点）にはほとんど影響しないと思われる。したがって、BSAの等電点は4.9で、Hbの等電点6.8より低いので、pH8.6でBSAはHbより大きい負の荷電を帯び、より陽極側に泳動されると考えられる。Hbの泳動距離7.5mmとBSAの泳動距離17.5mmは、電圧を50Vから100Vに2倍にすると、同じ泳動距離に達する時間が60分から30分となり2分の1の時間でよいことがわかった。定電圧でBSAとHbを電気泳動すると、泳動距離は通電時間が同じならば、イオン強度が0.04でも0.06でも同じになることがわかった。

しかし、泳動に使用した緩衝液の液温の変化は50Vの定電圧で60分通電すると、イオン強度0.04で泳動前12℃が、泳動後37℃に、イオン強度0.06で泳動前12℃が泳動後45℃に上昇した。また、100Vの定電圧で30分通電するとイオン強度0.04で泳動前12℃が泳動後38℃に、イオン強度0.06で泳動前12℃が泳動後47℃まで上昇した。また、このときの室温は27℃であった。緩衝液の液温の増加分はイオン強度0.04の場合、50V，60分で25℃（0.42℃／分）、100V，30分

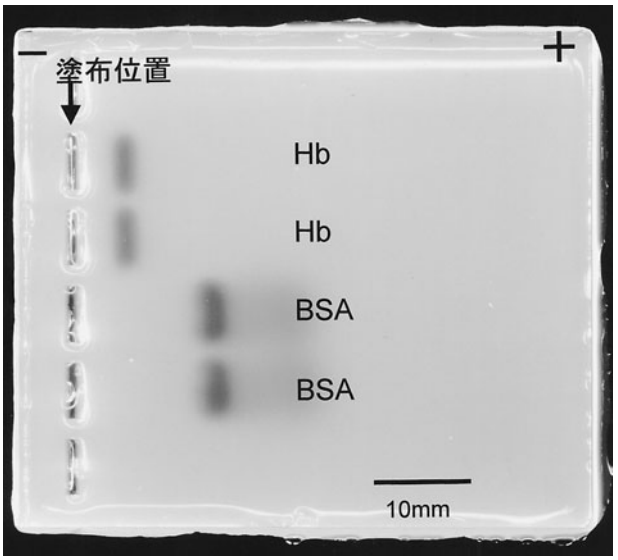

図1．ヘモグロビンと牛血清アルブミンの電気泳動像

支持体に1.5%アガロースS、泳動用緩衝液にベロナール緩衝液（pH8.6、イオン強度0.04）を用い50Vの定電圧で60分間通電した。

上の2つのレーンはHb　（ヘモグロビン）20 μl、下の2つのレーンはBSA+BPB　（牛血清アルブミン+ブロムフェノールブルー）30 μlを用いたときの電気泳動像を示す。

で26℃(0.87℃／分)、0.06の場合50V, 60分で33℃(0.55℃／分)、100V, 30分で35℃（1.17℃／分）であった。イオン強度が同じ場合、泳動に用いた電圧が50Vから100Vに2倍になると、単位時間当たりの温度上昇の程度が約2倍になることがわかった。実験中、泳動槽の温度が50℃以上になると電源ヒューズが切れ、電気泳動が中断することがあった。したがって、学生実習の場合、泳動距離と通電終了後の緩衝液の液温を考慮すると、ベロナール緩衝液のイオン強度0.04、50V定電圧、通電時間60分が適切である。失敗した学生がやり直す場合等、急ぐ場合は同一の緩衝液を用いて100Vで30分の通電でもよいが、通電時間当たりの温度上昇率が大きいので注意が必要である。

2．学生実習への適用

問題点のうち第1～第4はセルロースアセテート膜に起因する問題で、第2と第3はアガロースゲルに換えることで問題解決できた。第1はセルロースアセテート膜が裂けやすいという支持体の脆弱性に関するもので、結果には示さないが、取扱いが容易なアガロースゲル濃度は1.5%であった。第4はアガロースゲルを作成するとき、コーム（櫛形の板）を用いるとサンプル注入用の穴ができるので、注入が容易になった。第5はMupid-3がサブマリン型の電気泳動法が可能で、ブリッジを必要としないため解決できた。

さらに、今回は試料として色素蛋白であるヘモグロビン（Hb）と牛血清アルブミン（BSA）に予めブロモフェノールブルー（BPB）を結合させたものを用いた。このことで、泳動中の2つのタンパク質の移動の様子を観察しながら実験できるようになった。また、泳動後の染色、固定、脱色の操作が不要になるので、実習時間の短縮も可能となった。以上のことから、学生実習への適用が十分に可能であると考えられる。

ま と め

学生に電気泳動法の基本的操作の習得および電気泳動の原理を理解させる良い実験方法が確立出来た。

Mupid-3を用いてタンパク質を電気泳動する場合の条件は以下のとおりである。

泳動用緩衝液　：ベロナール緩衝液pH8.6
　　イオン強度　0.04
アガロースゲル：1.5%アガロースS
通電条件　　：50Vで60分間
試料　　：HbとBSA+BPB

実習方法を学生に近い視点を持ったティーチングアシスタントからの指摘によって改善することが出来た。今後、他の実習項目についてもこのような取り組みを続けていきたいと考えている。

参考文献

1）金井正光編：臨床検査法提要　改訂第32版, 金原出版, pp 481-486, 2005
2）芝紀代子：目で見る電気泳動法 1 セルロースアセテート膜, 医歯薬出版, pp 1-36, 1988
3）超小型電気泳動システム　Mupid-3 取扱説明書, コスモバイオ株式会社
4）芝紀代子：目で見る電気泳動法 2 寒天・アガロースゲル, 医歯薬出版, pp 1-15, 1989
5）梅田敬子, 金村茂：寒天ゲル電気泳動法, Medical Technology 7 : 1169-1173, 1979
6）橋本寿美子：セルロースアセテート膜電気泳動法, Medical Technology 7 : 1161-1168, 1979
7）山岸安子：電気泳動に用いられる緩衝液, Medical Technology 7 : 1139-1142, 1979

An examination of separation conditions for proteins by agarose electrophoresis with Mupid-3

Keiko Homma, Mikiko Nagashima*, Hiroyuki Sakurai**,
Tomoko Kurumizawa***, Kazuhiro Mawatari