

トリス塩酸緩衝液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* 三田 陽子* 齊藤 淳一* 馬渡 一浩

Key words

Electrophoresis, tris-HCl buffer, protein separation, agarose gel

はじめに

臨床検査では血清や尿中のタンパク質の分析を電気泳動法で行っている¹⁻³⁾。そのため、検査技術科学専攻では電気泳動法の原理の理解や操作方法の習得を目的として2年次に実習を行っている。我々は前報¹⁾で学生実習でセルロースアセテート膜を使用することの問題点を指摘し、簡易型電気泳動装置Mupid-3²⁾とアガロースゲルを用いることでこの問題を解決することができた。

現在、臨床検査で血清タンパク電気泳動法や乳酸脱水素酵素アイソエンザイムの分析^{3,4)}にはバルビタール緩衝液が用いられている。バルビタールは向精神薬第3種の指定を受けているため、購入や保管等にかかなり厳しい規制がある。そこで、規制対象とならない試薬を用いた緩衝液に変えることが必要であると考えた。

電気泳動に用いるバルビタール緩衝液のpHは8.6である。緩衝域が弱アルカリ性にある緩衝液のうち生化学分野で使用されるものにトリス塩酸緩衝液がある。今回、前報で確立した泳動条件の中で、泳動用緩衝液をトリス塩酸緩衝液に変更して、タンパク質の電気泳動が可能かどうか検討を行ったところ、良好な条件を見出したので報告する。

方 法

1. 試 料

試料は分子量がほぼ同じで、等電点の異なるヘモグロビン(Hb:分子量6.5万,等電点6.8)と牛血清アルブミン(BSA:分子量6.9万,等電点4.9)を用いた。

1) 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、10,000回転で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) BSA溶液

泳動距離と泳動状況を観察するため、予めBSAをプロモフェノールブルー(BPB)で染色したもの⁵⁾を試料とした。

BSA(和光純薬,特級)2g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。

さらに、2%BSA溶液1mLに0.1%BPBエタノール溶液を0.2mL添加し、BSAにBPBを結合させたものをBSA(+BPB)溶液とした。

2. 試 薬

1) バルビタール緩衝液(pH8.6)

市販の60mmol/Lバルビタール緩衝液(pH8.6,イオン強度0.06,和光純薬)を1.5倍に希釈して、40mmol/Lバルビタール緩衝液(イオン強度0.04)を調整した。

2) トリス塩酸緩衝液(pH8.6)

500mmol/Lトリス溶液はトリスヒドロキシルメチルアミノメタン(和光純薬,特級)60.57gを蒸留水に溶解して1000mLとした。

500mmol/Lトリス塩酸塩溶液はトリスヒドロキシルメチルアミノメタン塩酸塩(和光純薬,特級)78.8g

金沢大学医薬保健研究域保健学系
* 金沢大学大学院医学系研究科保健学専攻

を蒸留水に溶解して1000mlとした。

500mmol/l トリス塩酸緩衝液は500mmol/l トリス溶液に500mmol/l トリス塩酸塩溶液を加えて、pHを8.6になるよう調整した。また、これを希釈して種々の濃度のトリス塩酸緩衝液を調整した。

3) 1.5%アガロースゲル

アガロースS (和光純薬) を100ml のガラス三角フラスコに0.3g秤り、20ml のバルビタール緩衝液あるいはトリス塩酸緩衝液を加えた。これを電子レンジで30~40秒加温溶解後、70℃以下になるよう2~3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、70℃以下に放冷した1.5%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。泳動槽にバルビタール緩衝液あるいはトリス塩酸緩衝液を300ml入れ、同じ緩衝液で調整した1.5%アガロースゲルをセットした。Hb溶液は20μl、BSA (+BPB) 溶液は30μlを塗布量とし、各々ウェルに注入し、50Vの定電圧で電気泳動した。

結果と考察

1. トリス塩酸緩衝液の濃度

前報で、アガロースゲル電気泳動では、緩衝液の温度上昇はバルビタール緩衝液のイオン強度(濃度)に比例することを示した¹⁾。したがって、緩衝液をバルビタール緩衝液からトリス塩酸緩衝液に変更する際、最も留意すべき点は泳動中の緩衝液の温度上昇である。そこで、トリス塩酸緩衝液の濃度を変えて泳動緩衝液の温度上昇について調べることにした。

前報で用いたバルビタール緩衝液は、イオン強度が0.04(40mmol/l)であった。イオン強度が0.04に

表1. 50Vで60分間通電したときの温度上昇

泳動用緩衝液	平均±S.D (°C)
100mmol/l トリス塩酸	24.0±3.5
75mmol/l トリス塩酸	18.5±2.0
50mmol/l トリス塩酸	14.5±1.5
40mmol/l バルビタール	23.5±2.5

n=5

相当するトリス塩酸緩衝液の濃度は200mmol/l⁶⁻⁷⁾である。そこで200mmol/lのトリス塩酸緩衝液を用いて、50Vで通電を開始したところ、約18分後にヒューズが切れ電気泳動が中断した。そこで、200mmol/lを希釈して、100mmol/l、75mmol/l、50mmol/lとし、各々の溶液について実験した。これらの緩衝液を用いて50Vで60分間通電したが、どれも泳動の途中でヒューズが切れることはなかった。50Vで60分通電したときの緩衝液の温度上昇を表1に示した。各々の温度上昇は100mmol/lで24.0℃、75mmol/lで18.5℃、50mmol/lで14.5℃で、トリス塩酸緩衝液の場合でも温度上昇は濃度に比例していた。また、40mmol/lバルビタール緩衝液は23.5℃で100mmol/lトリス塩酸緩衝液とほぼ同じであった。

この実験結果から、電気泳動にトリス塩酸緩衝液を用いる場合、濃度は100mmol/lより低濃度を用いる必要があることがわかった。

2. 電気泳動条件

100mmol/l、75mmol/l、50mmol/lトリス塩酸緩衝液と40mmol/lバルビタール緩衝液を電気泳動用緩衝液として用い、Hb溶液とBSA (+BPB) 溶液の移動距離を指標として、電気泳動条件を調べた。50Vで45分間通電したところ、泳動用緩衝液がトリス塩酸緩衝液に変わってもBSA (+BPB) とHbは陽極側に移動し、BSA (+BPB) の方がHbよりも陽極側に泳動された。50Vで45分間通電したときのBSA (+BPB) とHbの泳動距離を表2に示した。トリス塩酸緩衝液の場合には100mmol/lでは、BSA (+BPB) が18mm、Hbが7mm、75mmol/lでは、BSA (+BPB) が19mm、Hbが8mm、50mmol/lではBSA (+BPB) が20mm、Hbが9mmであった。トリス塩酸緩衝液の濃度が下がると泳動距離は長くなった。また、40mmol/lバルビタール緩衝液では、

表2. 50Vで45分間通電したときの泳動距離

泳動用緩衝液	BSA (+BPB) (mm) 平均±S.D	Hb (mm) 平均±S.D
100mmol/l トリス塩酸	18.0±1.0	7.0±0.5
75mmol/l トリス塩酸	19.0±1.0	8.0±1.0
50mmol/l トリス塩酸	20.0±1.5	9.0±1.0
40mmol/l バルビタール	17.0±1.0	7.0±0.5

n=5

泳動距離はBSA (+BPB) が17mm、Hbが7 mmであった。このことから、BSA (+BPB) とHbの電気泳動パターンはトリス塩酸緩衝液もバルビタール緩衝液もほぼ同じであることがわかった。

学生実習では、どの濃度のトリス塩酸緩衝液でもBSA (+BPB) とHbの分離が可能であるならば、温度上昇率が小さいものを使う方が安全である。夏期の水温を25℃と考えると50mmol/lを使用すれば、40℃を超えずに電気泳動が可能であり、途中でヒューズが切れ泳動が中断することもないと考えた。

したがって、Mupid-3を用いて泳動用緩衝液にトリス塩酸緩衝液を使用する場合、緩衝液の濃度は50mmol/lとし通電条件は50Vで45分が望ましいと考えられる。

また、バルビタール緩衝液は1回の生化学実習で500mlの緩衝液を7本購入する必要があり、約1万円必要になる。50mmol/lトリス塩酸緩衝液を3500ml作成するのに必要な粉末試薬の価格は約1750円である。緩衝液だけで見ると、5分の1以下のコストで実習できることになる。

以上のことから、トリス塩酸緩衝液を用いることで、向精神薬第3種に指定されているバルビタールの使用を避けることができ、かつ、安価で、ほぼ同程度の分離が可能となることがわかった。

まとめ

今回、バルビタール緩衝液の代わりにトリス塩酸緩衝液を用いるタンパク質の電気泳動条件について

検討した。その結果、以下の条件でバルビタール緩衝液の場合とほぼ同程度にHbとBSA (+BPB) が分離できることがわかった。

泳動用緩衝液	: 50mmol/lトリス塩酸緩衝液pH8.6
アガロースゲル	: 1.5%アガロースS
通電条件	: 50Vで45分間
試料	: HbとBSA(+BPB)

今後、トリス塩酸緩衝液を用いたアガロースゲル電気泳動法による酵素のアイソザイム分析が可能かどうか検討する予定である。

文 献

- 1) 本間啓子, 永島幹子, 櫻井裕之, 他: 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, 金大医保つるま保健学会誌31(2): 81-83, 2007
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 芝紀代子; 目で見える電気泳動法 1 セルロースアセテート膜, 医歯薬出版, pp 1-36, 1988
- 5) 橋本寿美子: セルロースアセテート膜電気泳動法, Medical Technology, 7: pp 1161-1168, 1979
- 6) 浦山修, 中山年正, 入野勤, 他: 臨床検査学講座 第2版 臨床化学検査, 医歯薬出版, pp 333-334, 2006
- 7) 山岸安子; 電気泳動に用いられる緩衝液, Medical Technology, 7: pp 1139-1142, 1979

An examination of separation conditions for proteins by agarose electrophoresis using Tris-HCl buffer

Keiko Homma, Mikiko Nagashima*, Yoko Mita*, Junichi Saito*, Kazuhiro Mawatari