速 報

シクロヘプタアミロース-グアニジン系に溶解したフルオレセインイソチオシアネートを用いたたん白質のメンブランフィルター上でのけい光分析

木下俊夫, 飯沼文夫, 辻 章夫*

(1974 年 8 月 31 日受理)

たん白質の微量定量には最近主として Lowry 法¹⁾ が用いられている。これは、この方法が迅速で高感度であることによるが、それでも $5 \mu\text{g/ml}$ 以下の試料の測定は困難であり²⁾、低分子の共存物質（アミンなど）による障害も無視できない³⁾。そこで微量のたん白質をメンブランフィルター上に集め、アミドブラックで染色したのち、これを溶出して吸光度を測定する方法がくふうされた^{2)~4)}。この方法によって低分子物質による障害はほとんど除かれたが、比色法であるため感度はあまり高いとはいえず、また色素を溶出してから測定するため、操作もやや繁雑であった。一方けい光分析法としては、最近 Fluorescamine 法⁵⁾ が開発されたが、これも低分子アミンによる障害があり、これの除去⁶⁾が繁雑であった。

著者らはたん白質の微量分析法の研究^{7)~9)}の一環として、メンブランフィルター上でたん白質をフルオレセインイソチオシアネート (FITC)¹⁰⁾ でけい光染色し、ただちにスキヤニングけい光光度計で測定する迅速で高感度な定量法を確立した。この方法では低分子物質および過剰の試薬は操作中に洗い流されてしまうので、定量を妨害しない。また FITC は中性では水に難溶であり、通常アルカリ性で反応が行われてきたが¹¹⁾、著者らはこの試薬がシクロヘプタアミロース (C7A)⁸⁾ と塩酸グアニジンの混液によく溶解することを見だし、この溶液を用いて中性付近でたん白質をけい光ラベル化することができた。なお C7A あるいはグアニジンの一方では溶解度がふじゅうぶんなので、この可溶化には包接化を含む複雑な機構⁹⁾ が関与しているものと予想される。

操作法: FITC 5 mg を 100 mg の C7A を含む 0.5

* 昭和大学薬学部: 東京都品川区旗の台 1-5-8

Fig. 1 Suction device

a: Measuring pipet; b: Bored plastic disk; c: Clip;
d: Membrane filter strip; e: Cut polyethylene film;
f: Three way stopcock

ml の 8M 塩酸グアニジンに溶解して染色液とする。たん白質 $0.5 \sim 4 \mu\text{g}$ を含む試料溶液に、 $0.1M$ 濃度になるように塩化マグネシウム³⁾を加えておき、Sartorius Membran-filter SM 113⁴⁾を 10mm 幅（長さは試料数に応じて決める）にスポットする。試料の液量が $2 \mu\text{l}$ あるいはそれ以下であればそのままマイクロピペットでスポットする。 $2 \mu\text{l}$ 以上 2ml までの場合には次のようにしてたん白質をメンブラン上に濃縮する。上記のように切ったメンブランを Fig. 1 に示す吸引装置の上に置き、Fig. 1 に示したプラスチック板でおさえる。試料溶液はメスピペットに吸い取り、その先端をメンブラン上に密着させ、装置をアスピレーターで吸引しながら徐々に流下させる。たん白質は直径約 3mm のスポットとなる。たん白質をスポットしたメンブランは上記の染色液につけ、30 分間常温に放置してから取り出し、 $0.1M$ ホウ酸ナトリウムで 1 分間振とうしながら洗う。洗浄を 3 回くりかえし、ヤマト科学製スキヤニングけい光光度計 SFR-21 型を用いてメンブラン上のスポットのけい光強度を測定する。

検量線はウシ血清アルブミン $0.5 \sim 4 \mu\text{g}$ の範囲で直線性を示す。ウシ血清アルブミンに対し、50 倍量の次に示す化合物を添加しても定量は障害されなかった。塩酸グアニジン、*n*-ブチルアミン、トリスヒドロキシメチ

ルアミノメタン、塩酸チアミン、L-アスコルビン酸、塩化カリウム、炭酸水素ナトリウム、サリチル酸、クエン酸、グリシン、ヒスチジン、ヒスタミン二塩酸。

なお、C7A-塩酸ゲアニジン系で可溶化した FITC 溶液はアルカリに不安定なたん白質にも適用できるので、免疫化学、生化学の分野でのけい光ラベル化¹¹⁾にも有用であると期待される。また本法を臨床分析に応用する際にはヒト血清 アルブミンのけい光強度、アルブミン-グロブリン間でのけい光強度の比、および黄だん血清中での定量条件の検討などが重要になると考えられるので、これらについて今後の問題点として検討する予定である。

文 献

- 1) O. H. Lowry, N. J. Rowebrough, A. L. Farr, R. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 2) W. Schaffner, C. Weissman: *Anal. Biochem.*, **56**, 502 (1973).
- 3) H. Kuno, H. K. Kihara: *Nature* (London), **215**, 974 (1967).
- 4) T. Nakao, M. Nakao, F. Nagai: *Anal. Biochem.*, **55**, 358 (1973).
- 5) S. Stein, P. Böhlen, W. Dairman, S. Udenfriend: *Arch. Biochem. Biophys.*, **155**, 213 (1973).
- 6) P. Böhlen, S. Stein, K. Imai, S. Udenfriend: *Anal. Biochem.*, **58**, 559 (1974).
- 7) T. Kinoshita, F. Iinuma, A. Tsuji: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 666 (1973).
- 8) T. Kinoshita, F. Iinuma, A. Tsuji: *Anal. Biochem.*, **61**, 632 (1974).
- 9) T. Kinoshita, F. Iinuma, A. Tsuji: *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 2413, 2421 (1974).
- 10) M. Hiramatsu, N. Okabe, K. Tomita: *J. Biochem.*, **73**, 971 (1973).
- 11) 木下俊夫 (田村喜蔵, 太幡利一, 保田和雄編):

“けい光分析”, p. 121 (1974), (講談社).

☆

Fluorometric assay of protein on a membrane filter using fluorescein isothiocyanate dissolved in cycloheptaamylose-guanidine system. Toshio KINOSHITA, Fumio IINUMA and Akio TSUJI (School of Pharmaceutical Sciences, Showa University, 1-5-8, Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo)

A sensitive, specific, and simple method for the micro-assay of protein on a membrane filter is described. In the present study, fluorescein isothiocyanate (FITC) was found to be readily soluble in cycloheptaamylose solution in 8 M guanidine and the resultant mixture was employed in the fluorescent staining of a protein spotted on a membrane filter. Reagent: Five milligrams of FITC is dissolved in 0.5 ml of 8 M guanidine hydrochloride containing 100 mg cycloheptaamylose. Procedure: A sample solution containing 0.5 μ g to 4 μ g of protein is made 0.1 M with respect to magnesium chloride prior to the assay. When the volume of the sample solution is not more than 2 μ l, the sample is spotted with the aid of micropipet on Sartorius Membranfilter SM 113 of 10 mm wide. When the volume is in the range of 2 μ l to 2 ml, the protein is collected by filtering the sample solution through the membrane filter employing the suction device illustrated in Fig. 1. The spotted membrane is immersed into the reagent mentioned above and allowed to stand for 30 min at room temperature. The membrane is then rinsed three times with agitation for each 1 min in 0.1 M sodium tetraborate. The fluorescence intensity of the spot is measured with Yamato Scanning Fluorometer, Model SFR-21. Results: The standard curve for bovine serum albumin was linear in the range of 0.5 μ g to 4 μ g. Amines, amino acids, and other substances of low molecular weight tested did not affect the assay. The reagent herein described may also be applicable to the fluorescent labeling of protein in solution.

(Received Aug. 31, 1974)