DISC 電気泳動法 (その 2)

菊 谷 元 資

(Motosuke KIKUTANI)

長崎大学薬学部生化学教室

VIII. 希薄蛋白質溶液に対する特殊操作法

既述のごとく、DISC 電気泳動法の特徴の 1 つとして、cm の位で量れる試料溶液量が、分離ゲルに入る前にきわめて薄い層に濃縮されることがあげられるが、粗製試料を精製する過程で希薄になった各分画（たとえばカラムクロマトグラフィーを行なうような場合）の純度検定や、使用した精製法の適否、あるいは成否を判定する場合に、この特徴を最も有効に利用することができる。しかしながら、この場合には標準操作法をそのまま応用しがたいので、希薄溶液に対してはゲルの重合をさまたげるような過剰な希釈をさけるため、もっと濃度の高いゲル溶液を用いなければならない。

1) 希薄溶液の場合

標準保存溶液 (D) の代りに、次の組成の保存溶液 (D') を使用する。(D') 以外は標準保存溶液が用いられる。

保存溶液:	(D') Acrylamide	20.0 g
	Bis	5.0 g
	H ₂ O to make	100 ml

使用液:

1 part (B), 1 part (D'), 1 part (E), 4 parts (F)。

試料用ゲル溶液の調製には、1 part の試料溶液を 7 parts の上記使用液と混合する。

2) 非常に希薄な場合

この場合も保存溶液 (D') および (F') 以外は標準保存溶液が用いられるが、次の割合で調製した使用液が用いられる。

使用液:

1 part (B), 1 part (D'), 1 part (E), 2 parts (F')

(40 g sucrose/50 ml H₂O)。

3 parts の試料溶液と 5 parts の上記使用液を混合して、試料用ゲル溶液を調製する。もし、得られるゲルが 0.3 ml 以上になる場合には、濃縮用ゲル溶液の量も比例して増すようにする。

IX. Pore size の異なるゲルの調製

標準操作法では、ゲルの pore size は試料用および濃縮用ゲルにともに 2.5%, 分離用ゲルに 7.5% のものが使用されている。ふつう最もよく扱われる蛋白質は分子量が 1 万~30 万の範囲にあり、既述のごとく分子量 1 万~100 万の蛋白質は標準ゲルを用いて電気泳動できるので、ほとんどの場合、標準操作法で電気泳動を行なうことが可能である。しかしながら、分子量 1 万以下、あるいは 100 万以上の蛋白質を研究対象とする場合が生ずる。この場合は、分離用ゲルの pore size を変えることによって目的を達することができる。

1) Smaller pore gels

分子量 1 万以下最小 2,000 の試料に用いる。

保存溶液 (C) の代りに次に示される保存溶液 (C') を用い、他は標準保存溶液を用いてゲルを調製する。

保存溶液:	(C') Acrylamide	60 g
	Bis	0.4 g
	H ₂ O to make	100 ml

使用液の調製に用いられる保存溶液 (C') の容量は次の式により算出して求め、

$$C' = \text{求める濃度の \%} \div 7.5\%$$

また、使用液に用いられる水の容量は次の式から求められる。

$$H_2O = 4 - (C' + 1)$$

たとえば、15% ゲルを調製する場合、

$$C' = 15 / 7.5 = 2 \text{ parts, } H_2O = 4 - (2 + 1) = 1 \text{ part.}$$

したがって、15% ゲル用使用液は次の組成によればよい。

1 part (A), 2 parts (C'), 1 part H₂O。

上記使用液と保存溶液 (G) とを 1:1 の割合に混合してゲルを形成させる。

22.5% ゲルまでは保存溶液 (C') を用いて作ることができるが、それ以上の % のゲルを作る場合には、保存溶液 (G) の濃度を高くするために次の組成に従って調製して用いるとよい。

保存溶液:	(G') Amm. persulfate	0.14 g
	H ₂ O to make	75 ml

たとえば、30% ゲルを作る場合は次の使用液を用いる。

使用液：

1 part (A), 4 parts (C'), 3 parts (G').

30% 以上の濃度のゲルは実際上有用ではない。

2) Larger pore gels

分子量 100 万以上 200 万くらいまでの蛋白質に用いられるが、分子量 50 万以上と推定されるものについても試みてみるとよい。7~4% ゲルおよび 3.75% ゲルの調製について述べる。

(i) 7~4% ゲル：

7~4%の範囲内にあるゲルの調製には、保存溶液(C)以外は標準保存溶液が用いられるが、求める%のゲルの調製には次式により計算したアクリルアミド量をもって調製した保存溶液(C)を用いる。

たとえば、4% ゲルを作る場合、

$$\frac{28 \text{ g}}{X} = \frac{7.0}{4}, \quad X = \frac{28 \text{ g}}{1.75} = 16 \text{ g}$$

保存溶液(C)のアクリルアミド量を 16 g にして調製した溶液を用いれば、4% ゲルを作ることができる。

(ii) 3.75% ゲル：

保存溶液(C)の代りに次の組成の溶液(C')を用いる。

保存溶液：	(C')	Acrylamide	15 g
		Bis	0.4 g
		H ₂ O to make	100 ml

使用液としては下記分離用ゲル溶液以外は標準使用液が使用される。

分離用ゲル溶液：

1 part (A), 2 parts (C''), 1 part (E).

この場合、保存溶液(G) (触媒)を使用せずに、蛍光灯の光で重合させる。溶液中のアクリルアミド濃度が一定の場合、化学重合させるより光重合させるほうが pore size の大きいゲルが形成されるからである。

X. pH の異なるゲルの調製

既述の標準操作法では pH 9.5 run について述べたけれども、取り扱い試料の性質が異なると、それに応じた泳動条件が必要となる。そこで、試料の性質に応じて各種の pH で行なえるよう、種々の pH での泳動条件が考案されているので、以下 pH 9.5run* 以外の各種 pH で

* DISC 電気泳動の特徴の 1 つは、試料用および調製用ゲルと分離用ゲルとの間の pH、電極槽用緩衝液の pH が異なることであり、また分離用ゲル内の pH も泳動開始時と試料の分離が行なわれるときは pH 間にずれが約 0.5 くらいあるから、標準の分離用ゲルの pH は 8.9~9.0 であるが、試料の分離が行なわれているときは 9.4~9.5 になる。したがって、この場合、通常 pH 9.5 run と称している (図 1, Vol. 7, No. 9, p. 546 参照)。

のゲルの調製について述べる。

1) pH 8.0 ゲル⁽⁵⁾

(i) 保存溶液：

(A)	1 N HCl	48 ml	(B)	1 N HCl	48 ml
	Tris	6.85 g		(or 1 M H ₃ PO ₄)	39 ml
	Temed	0.46 ml		Tris	4.95 g
	H ₂ O to make	100 ml		Temed	0.46 ml
		(pH 7.5)		H ₂ O to make	100 ml
					(pH 5.5)
(H)	Diethylbarbituric acid	5.52 g			
	Tris	1.0 g			
	H ₂ O to make	1 liter			
		(pH 7.0)			

他の保存溶液は標準 (pH 9.5) ゲル用の組成と同じ。

また、使用液の混合割合も同じである。

2) pH 6.6 ゲル⁽⁷⁾

(i) 保存溶液：

(A)	Glycine	114 g	(B)	1 N KOH	48 ml
	Temed	0.46 ml		Glycine	4.8 g
	H ₂ O to make	600 ml		Temed	0.46 ml
		(pH 7.2)		H ₂ O to make	100 ml
					(pH 10.3)
(C)	Acrylamide	60 g	(H)	Glycine	13.7 g
	Bis	1.6 g		2-6-Lutidine	38.2 ml
	H ₂ O to make	100 ml		H ₂ O to make	1 liter
					(pH 8.3)
(G')	Amm. persulfate	0.14 g			
	H ₂ O to make	25 ml			

他の保存溶液は標準ゲル用溶液と同じ。

(ii) 使用液：

a) 試料用および濃縮用ゲル溶液

1 part (B), 2 parts (D), 4 parts H₂O.

ゲル調製の際は、上記溶液 7 parts と保存溶液(G') 1 part とを混合して室温に放置する。

b) 分離用ゲル溶液 6 parts (A), 1 part (C).

上記溶液 7 parts と保存溶液(G') 1 part とを混合してゲルを調製する。

電気泳動を行なう場合、電極は上槽をプラス(+)に、下槽をマイナス(-)に接続するか、あるいは泳動カラムを逆にして、すなわち分離用ゲル側を上にして上槽のカラムアダプターに差し込んで行なうかしなければならない。

3) pH 4.3 ゲル (15%)⁽⁸⁾

(i) 保存溶液：

(A)	1 N KOH	48 ml	(B)	1 N KOH	48 ml
	Glacial acetic acid	17.2 ml		Glacial acetic acid	2.87 ml
	Temed	4.0 ml		Temed	0.46 ml
	H ₂ O to make	100 ml		H ₂ O to make	100 ml
		(pH 4.3)			(pH 6.7)
(C)	Acrylamide	60 g	(G)	Amm. persulfate	0.28 g
	Bis	0.4 g		H ₂ O to make	100 ml
	H ₂ O to make	100 ml			
(H)	β-Alanine	31.2 g	(J)	Tracking dye	
	Glacial acetic acid	8.0 ml		0.01% Methyl green soln.	
	H ₂ O to make	1 liter			
		(pH 4.5)			

上記以外は標準保存溶液を用いる。

(ii) 使用液：

a) 分離用ゲル溶液

1 part(A), 2 parts(C),

1 part H₂O.

保存溶液 (G) と 1 : 1 の割合で混合して用いる。

b) 試料用および濃縮用ゲル溶液

1 part(B), 2 parts(D) (標準),

1 part(E) (標準), 4 parts H₂O
(pH 6.7).

4) pH 4.3 ゲル (7.5%)

保存溶液 (C) のみを次の組成に変更し、その他は pH 4.3 (15%) 用に調製した保存溶液および標準保存溶液を用いる。

保存溶液：	(C) Acrylamide	30 g
	Bis	0.8 g
	H ₂ O to make	100 ml

泳動時、電極は上槽を陽極(+), 下槽を陰極(-)とする。

5) pH 2.3 ゲル (7.5%)

(i) 保存溶液： 下記以外は標準保存溶液を用いる。

(A) 1 N KOH 48 ml Glacial acetic acid 213 ml Temed 4.6 ml H ₂ O to make 400 ml (pH 2.9)	(B) 1 N KOH 48 ml Glacial acetic acid 2.95 ml H ₂ O to make 100 ml (pH 5.9)
(C) Acrylamide 30 g Bis 0.8 g H ₂ O to make 100 ml	(G) Amm. persulfate 1.4 g H ₂ O to make 50 ml
(H) Glycine 28.1 g Glacial acetic acid 3.06 ml H ₂ O to make 1 liter (pH 4.0)	(J) Tracking Dye 0.01% Methyl green soln.

(ii) 使用液：

a) 試料用および濃縮用ゲル溶液

1 part(B), 2 parts(D), 1 part(E), 4 parts H₂O
(pH 5.9).

b) 分離用ゲル溶液

4 parts(A), 2 parts(C) (pH 2.9).

上記溶液を 3 : 1 の割合で保存溶液 (G) と混合する。この場合も、泳動時、上槽を陽極(+), 下槽を陰極(-)とする。低 pH ゲルで泳動する場合、tracking dye として methyl green 溶液を用いるとよい。

図 5 調製用 DISC 電気泳動装置

1. 上部電極槽
2. ゲル管
3. グラスフィルター保持筒
4. 下部電極槽
5. 白金電極
6. 水圧調節筒
7. 溶出管付中央冷却管
8. ゲル形成用キャップ
9. 溶出緩衝液供給瓶

XI. 調製用 DISC 電気泳動

DISC 電気泳動法がきわめて優れた分離能をもっていることから、この方法を調製用に利用しようとする試みは多くの研究者によって行なわれ、おのおの考案した装置を用いて行なった結果を報告している⁽⁹⁻¹³⁾。いずれも原理は分析用とまったく同じで、また装置もほぼ似たようなものとなっているが、分離した各成分をそれぞれ集める方法と、泳動中の発生熱を冷却する方法に種々工夫がなされている。

現在市販*されている装置の 1 つ (東洋科学産業製) について、次にその使用法を述べる。

1) 装 置

図 5 に示されるように、次の各部分から構成されている。ゲルの横断面積が大きいと発熱はかなり大きくなるので、本装置ではゲル管の外側はジャケットを備え、ゲル管の中央に三重管を通し、この管の中心を溶出管、その周囲を冷却管としている。このようにして、ゲルカラムを内外両側から冷却する。したがって、ゲルカラムはドーナツ型になっている。本装置では、ゲル下端面から分離されて出てくる各成分を、順次中央冷却管の溶出管を通してポンプで吸引して導き出す方法をとっている。この場合、ゲル下端から遊離される各成分が下部電極槽に拡散するのを防ぐために、ゲル下端面と 1 mm の間隙を作れるようグラスフィルターをセットして溶出室を設けてある (図 5 参照)。

* 東洋科学産業 K. K., ミツミ科学産業 K. K., Canalcó 社 (コロンビア貿易)。

(i) 上部電極槽：

槽の上部中央に中央冷却管用の固定口を備え、その横に上部電極取付口があり、この取付口はゲル溶液、試料溶液、上部緩衝液などの注入口もかねている。

(ii) ゲル管：

二重管になっており、内側管内にゲルを形成させ、試料の電気泳動を行なわせる中心部である。外側は冷却用ジャケットになっている。

(iii) グラスフィルター保持筒：

ゲル管と下部電極槽を連絡する緩衝液槽で、上部にグラスフィルターをはめ込んで分離用ゲル下端面との間隙が約 1 mm を保つようにしてある。二重管になっており、外側は冷却用ジャケットで、溶出用緩衝液注入口および気泡排出口を備えている。

(iv) 下部電極槽：

下部電極、水圧調節筒、および水平調節用の足がついている。装置全体の架台の役目もしている。

(v) 溶出管付中央冷却管：

三重管になっており、中央は溶出管で、分画された各成分はここを通過してフラクションコレクターに導かれる。

(vi) 水圧調節筒：

ゲルカラムの上部には多量の上部緩衝液が入れられるので、ゲルカラムにかなりの圧力が加わり、泳動中にゲルカラム自体が下降するのを防ぐため、下部槽からゲル下面に圧力を加え、上下の圧を平衡にしてゲルカラムの位置を安定させる目的で取り付けられたものである。

(vii) ゲル形成用キャップ：

ゲル管の下部に固定させて、ゲルの形成を行なわせるのに用いられる。

2) 標準ゲル溶液の調製

ゲル溶液の調製処方も種々あり、また分析用 DISC で用いたゲル溶液も使用されうるが、ここでは一般に広く使用可能な調製法をもって標準ゲル溶液と称し、次にその組成を掲げる。

(i) 保存溶液：

(A)	1 N HCl	24.0 ml	(B)	1 M H ₃ PO ₄ *	12.8 ml
	Tris	18.15 g		Tris	2.85 g
	Temed	0.23 ml		Temed	0.1 ml
	H ₂ O to make	100 ml		H ₂ O to make	100 ml
		(pH 8.9)			(pH 7.2)
(C)	Acrylamide	30.0 g	(D)	Acrylamide	5.0 g
	Bis	0.8 g		Bis	1.25 g
	H ₂ O to make	100 ml		H ₂ O to make	100 ml
(E)	Riboflavin	2.0 mg	(F)	Amm.	
	Sucrose	40 g		persulfate	0.14 g
	H ₂ O to make	100 ml		H ₂ O to make	100 ml

* 85% H₃PO₄ 68.3 ml を水で 1 l に希釈する。

(ii) 使用液：

a) 分離用ゲル溶液

1 part (A), 1 part (C), 2 parts (F).

b) 濃縮用ゲル溶液

1 part (B), 2 parts (D), 1 part (E).

(iii) 電極槽用緩衝液：

a) 上槽緩衝液

Tris	6.32 g
Glycine	3.94 g
H ₂ O to make	1 liter
	(pH 8.9)

b) 下槽用および
溶出用緩衝液

Tris	12.1 g
1 N HCl	50 ml
H ₂ O to make	1 liter
	(pH 8.1)

3) 操作法

(i) 分離用ゲルの調製：

上部電極槽とゲル管を接続、さらにゲル形成用キャップをゲル管の下部に接続し、中央冷却管を上部電極槽の中央の固定口から差し込み、中央冷却管の下端面中心（溶出管開口部）がキャップの中心に位置するようにセットする。次いで、中央冷却管の溶出管に水を満たした後、キャップ内面のゴムパッキングと中央冷却管下端面を密着させ、溶出管中の水が洩らない程度にして固定させる。溶出管中に水を満たすのは、分離用ゲル溶液をゲル管に注入した際、ゲル溶液が溶出管中に遡ってゲル形成時にゲル化して溶出管の栓をすることになるのを防ぐためである。濾過瓶中で分離用ゲル溶液を調製し、氷冷、攪拌を続けながら約 5 分間水流ポンプで脱気した後、タイゴンチューブ（内径 3/16～1/8 インチ）を付けた分液漏斗に移し、チューブをゲル管底部に達せしめ、静かに手早くゲル溶液を注入する。別に用意した蠕動ポンプにより、細いタイゴンチューブ（内径 1/16 インチ）か、あるいはアクリルガラス製の細い管を用いて、分離用ゲル溶液の上に水層を約 5～8 mm の高さに重ね、装置を水平に保って静置する。氷冷水をポンプで循環させ、重合中も冷却する。重合が終わったら蠕動ポンプで水層を取り去る。

用うべきゲル溶液の容量は試料量によって加減するが、試料を 100 mg 前後用いた場合、ゲル溶液は 40～60 ml 調製すればよい。

(ii) 濃縮用ゲルの調製：

分離用ゲルの上部を濃縮用ゲル溶液約 5 ml で 2 回洗った後、濃縮用ゲル溶液を (i) と同じ操作で注入、水層を重ねる。ゲル管の周囲を蛍光灯で囲み、光重合を行なわせる。濃縮用ゲル溶液の用量は、試料溶液量と同量調製すればよい。

図 6 調製用 DISC 電気泳動用機器接続図

(iii) 全装置の組立て：

分離用ゲルおよび濃縮用ゲルの調製が終わったら、下部キャップを注意深く静かにはずし、グラスフィルター保持筒を接続し、次いで下槽用緩衝液を満たした下部電極槽と接続する。グラスフィルター保持筒の溶出液導入口と溶出液槽を連結し、気泡排出口を開いて溶出液を流入させ、保持筒が緩衝液で満たされて気泡排出口から流出するようになったら排出口を閉じる。緩衝液はさらにグラスフィルターを通して溶出室に満たされるが、この際グラスフィルター下面に気泡が残らぬよう、とくに注意を要する。気泡が残った場合は、装置を傾けて気泡排出口から吸い出すようにすると除くことができる。蠕動ポンプの吸引端を溶出管上部口と連結し、ポンプを作用して溶出液が導かれるのを確かめる。次いで、ゲル管および上部電極槽に上槽用緩衝液を静かに注入する。この場合、濃縮用ゲル上辺を傷つけたり、破損したりしないよう充分注意する。水圧調節筒中の水位を緩衝液供給瓶を上下させることにより調節し、上槽緩衝液の水位より約 1 cm 高くなるようにセットする。これで全装置の組立てが完了する。

(iv) 試料溶液の調製：

本装置では、試料溶液の量は 5~120 ml の範囲内で泳動を行なわせることができる。乾燥試料の溶解には濃縮用ゲル溶液に用いた緩衝液が適当で、たとえば保存溶液(B)中の Temed のみを除いた組成の Tris-磷酸緩衝液を用いる。

本装置では、乾燥試料として約 120 mg くらいまでを負荷するのが適当である。蛋白質含量の高い液体試料のうち、ほとんど塩を含んでいないような場合は、濃度を高くした上記 Tris-磷酸緩衝液で希釈して用いる。また、塩をかなり含んでいる場合は、Tris-磷酸緩衝液に対して透析、平衡に達したところで用いるとよい。

本操作法では、試料用ゲルを作らないで試料溶液をそのまま濃縮用ゲルに積層して泳動させるので、試料溶液の積層をより容易にするため、sucrose を 3 g/100 ml の

割合で試料溶液に添加して溶液密度を高くしてやる。また、tracking dye として bromophenol blue 0.01 % (w/v) 溶液の 0.1 ml を試料溶液に加えてやると、泳動状況を知るのに便利である。

(v) 試料溶液の導入積層：

試料溶液は蠕動ポンプを用いて濃縮用ゲル上に導入、積層する。すな

わち、導入用チューブの先端を濃縮用ゲル表面から約 5 mm の距離でゲル管内壁に接しさせて後、ポンプを始動し、試料溶液を導入する。試料溶液は密度が高いので、壁に沿って降下してゲル上に積層される。試料溶液層が高くなるにつれて、導入用チューブも引き上げて行く。導入が終わった後で導入用チューブを取り去る際は、試料溶液層を攪乱しないようにとくに細心の注意を要する。

(vi) 泳動開始および実施上の諸注意：

試料溶液を積層した後、水圧調節筒の水位が上槽緩衝液の水位より約 1 cm 高くなるよう再び調節する。このことは、泳動中にゲルカラムの下降するのを防ぐのに、またグラスフィルターを通して溶出液が溶出室に流入しやすくするためにも大切なことである。

蠕動ポンプのスピードを加減して、溶出液の流量を決める。流量は 60~80 ml/hr を標準とする。

蠕動ポンプで溶出された溶出液は、UV 検出器を経由してフラクションコレクターに導かれる。この場合のチューブは、できるだけ径の細いものがよい (内径 1/32~1/16 インチ)。泳動電流は定電流として 50 mA の荷電

図 7 トリプシン消化ウシ成長ホルモンの精製過程

- a : ウシ成長ホルモン (BGH)
- b : トリプシン消化ウシ成長ホルモン (TBGH)
- c : TBGH-Fract. 12 (DEAE セルロースクロマト)
- d : TBGH-d (調製用 DISC 電気泳動精製)

図 8 塩基性蛋白質の DISC 電気泳動図

- a : トリプシンおよびキモトリプシンの同量混合物
b : キモトリプシン (Worthington 社製, 3 回結晶)
c : トリプシン (Worthington 社製, 3 回結晶)

図 9 塩基性ポリペプチドの泳動図

- a : 粗 ACTH (ヒツジ脳下垂体)
b : Lipolytic 活性物質 (100 μ g)
c : Lipolytic 活性物質 (40 μ g)
d : α_s -ACTH

(A)

(B)

図 10 調製用 DISC 電気泳動法による溶出曲線 (A) および各分画の分析用 DISC 電気泳動図 (B)

試料: ウサギ γ -G-免疫グロブリン light chain, BPB: tracking dye (bromophenol blue), M: 試料。

が適当である。通電を始めると、試料溶液と緩衝液との鈍い界面がなくなり、鋭い界面が見られるようになる。この電流は、試料の性質その他必要に応じて変えるとよい。たとえば、試料が濃縮ゲルに入ってしまうまでは、比較的希薄な溶液では低い電流で、少し濃度が高い場合は高い電流で行なうようにする。また、ゲル調製に用いた触媒により影響を受けやすいような蛋白質試料の場合には、触媒を除くため、あらかじめ数時間試料をかけないで通電しておいて後、泳動を行なわせると、よい結果が得られることもある。

電気泳動を行なうにあたり、必要な機器の接続の一例を図 6 に示す。

XII. DISC 電気泳動法の応用例

1) pH 9.5 run の電気泳動例 (中, 酸性蛋白質)

トリプシン消化ウシ成長ホルモン (TBGH, 分子量 22,000) から、ヒトに有効とみられる成分 TBGH-d の精製分離過程を、図 7 に示す⁽¹⁴⁾。pH 9.5, 7% ゲルを用いる標準操作法によって行なったものである。

2) pH 4.3 run の電気泳動例

(i) 塩基性蛋白質の場合:

キモトリプシンおよびトリプシンの純度検定を pH 4.3, 15% ゲルを用いて行なっている⁽⁶⁾。図 8 に見られるように、トリプシンは 3 回結晶のものでもなお少量の不純物 (キモトリプシンその他) を含んでいるのがわかる。キモトリプシンのほうは比較的不純物は少ないよう

図 11 尿素溶液中で行なった調製用 DISC 電気泳動
試料: Hemolysate, (A) 尿素なし, (B) 8M 尿素中, (C) 各分画の分析用 DISC 電気泳動図。

である。

(ii) 塩基性ポリペプチドの場合:

ヒツジの粗 ACTH (副腎皮質刺激ホルモン) から純粋な α_s -ACTH の CM-セルロースカラムクロマトによる精製過程, および新しい lipolytic 活性物質の分離を, 図 9 に示す⁽¹⁵⁾。この場合, 電極槽用緩衝液に β -alanine の代りに α -alanine を使用している。pH 4.3 run, 15 %ゲルを用いている。ACTH (分子量 4,500) よりさらに分子量の小さい塩基性ペプチド α -MSH (分子量 1,600) について同じ条件で行なわれている⁽⁶⁾。どちらも Amidoschwartz で染色される。

XIII. 調製用 DISC 電気泳動法の応用例

1) 標準操作法で行なう場合

ウサギの γ -G-immunoglobulin light chain 25 mg を, 2.5% の濃縮用ゲルおよび 8% の分離用ゲルで電気泳動させた⁽¹⁶⁾。図 10 (A) はその溶出曲線で, 2 時間でゲル中の未知 UV 吸収性物質が溶出され, 次いで tracking dye が溶出されてくる。その後に各成分が分離されて溶出され, 7 個のピークが得られる。各成分を分析用 DISC にかけてみると, 図 10 (B) に見られるように, 理想的に分離が行なわれていることが認められる。

2) 尿素溶液中で行なう場合

標準法で行なって分離があまりよくない場合, 尿素溶液中で行なうことにより, よい結果をうることもある。

Jovin ら⁽¹¹⁾ は hemolysate の分画操作で, 8M 尿素溶液中で泳動させ興味ある結果を報告している。図 11 (A) は尿素を用いない標準法での溶出曲線で, (B) は 8M 尿素中で行なったときの溶出曲線である。後者のほうが分離がよいことがわかる。

尿素を用いる場合の保存溶液および使用液の一例を次に示す⁽¹¹⁾。

保存溶液:

(A)	1N HCl	12.0 ml	(B)	1M H ₃ PO ₄	12.8 ml
	Tris	9.07 g		Tris	2.85 g
	Temed	0.12 ml		10M Urea	80 ml
	10M Urea	80 ml		H ₂ O to make	100 ml
	H ₂ O to make	100 ml			
(C)	Acrylamide	21.2 g	(D)	Acrylamide	5.0 g
	Bis	0.56 g		Bis	1.25 g
	10M Urea	80 ml		10M Urea	80 ml
	H ₂ O to make	100 ml		H ₂ O to make	100 ml
(G)	Catalyst		(E)	Riboflavin	2.0 mg
	Amm. persulfate	0.28 g		8M Urea to make	
	8M Urea to make	100 ml			100 ml

使用液:

- 分離用ゲル溶液
2 parts(A), 1 part(C), 1 part(G).
- 濃縮用ゲル溶液
1 part(B), 2 parts(D), 1 part(E).

また, Maizel は 8M 尿素溶液中 pH 4.3 の条件で, リボヌクレアーゼ, トリプシン, およびキモトリプシンの混合液を泳動させ, おおのこの分離に好結果を得ている。低 pH で尿素存在下で行なう場合も, 上記調製法に

図 12 ハプトグロビン-ヘモグロビン複合体の調製用 DISC 電気泳動実施図

準じて低 pH 保存溶液の組成をもって調製すればよい。

お わ り に

近年わが国においても、学会や雑誌などに DISC 電気泳動法を使用した研究が数多く発表されるようになった。分析用 DISC 電気泳動法はこのように現在広く普及されてきたが、調製用 DISC 電気泳動法のほうはまだあまり広く利用されておらないようである。したがって、本稿では調製用 DISC にかなり重点をおいて述べている。図 12 に調製用 DISC 電気泳動の典型的な実施例を示しておく。これはハプトグロビン-ヘモグロビン複合体を負荷したもので、試料自体が生体色素であるため濃厚な色を呈しており、試料が濃縮用ゲル内で濃縮され、分離用ゲル内で分離が行なわれている状態を、さらにゲル下端からポンプで吸引、運び去られる様子を実際に目で見ることができる。これを見ると、調製用 DISC が非常に分離能が優れており、強力な実験手法であることがわかる。今後、この実験法が大いに活用され、優れた研究がなされるであろうと期待している。

DISC 電気泳動法は主として蛋白質化学に利用されてきたが、蛋白質以外に核酸およびその分解物あるいは化合物の分離に応用する試みもなされている⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。このように、DISC 電気泳動法はその特徴を利用して各方面に広く応用されるようになるだろうが、今から本法を利用される方々に、本稿がいくらかでもお役に立つならば最上の喜びである。

文 献

- 1) O. Smithies : *Adv. Prot. Chem.*, 14, 65 (1959).
- 2) S. Raymond and L. Weintraub : *Science*, 130, 711 (1959).
- 3) L. Ornstein : *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, Art.

- 2, 321 (1964).
- 4) B. J. Davis : *ibid.*, 121, Art. 2, 404 (1964).
- 5) D. E. Williams and R. A. Reisfeld : *ibid.*, 121, Art. 2, 373 (1964).
- 6) 永井裕 : 蛋白質・核酸・酵素 (別冊) 生物化学実験法 IX, 共立出版, 1967, p. 3.
- 7) H. W. Taber and F. Sherman : *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, Art. 2, 600 (1964).
- 8) R. A. Reisfeld, U. J. Lewis and D. E. Williams : *Nature*, 195, 281 (1962).
- 9) U. J. Lewis and M. Clark : *Anal. Biochem.*, 6, 303 (1963).
- 10) D. Racusen and N. Calvanino : *ibid.*, 7, 62 (1964).
- 11) T. Jovin, A. Chrambach and M. A. Naughton : *ibid.*, 9, 351 (1964).
- 12) P. H. Duesberg and R. R. Rueckert : *ibid.*, 11, 342 (1965).
- 13) J. V. Maizel, Jr. : *Ann. New York Acad. Sci.*, 121, Art. 2, 382 (1964).
- 14) M. Sonenberg, M. Kikutani, C. A. Free, A. C. Nadler and J. M. Dellacha : *ibid.*, 148, Art. 2, 532 (1968).
- 15) Y. Birk and C. H. Li : *J. Biol. Chem.*, 239, 1048 (1964).
- 16) R. A. Reisfeld, J. K. Inman, R. G. Mage and E. Appella : *Biochem.*, 7, 14 (1968).
- 17) E. G. Richards, J. A. Coll and W. B. Gratzer : *Anal. Biochem.*, 12, 452 (1965).
- 18) C. W. Dingman and A. C. Peacock : *Biochem.*, 7, 659 (1968).
- 19) A. C. Peacock and C. W. Dingman : *ibid.*, 7, 668 (1968).