(日本化学会誌, 1989, (7), p. 1169~1171)

© 1989 The Chemical Society of Japan

白金コロイドを用いるタンパク質の高感度検出法

(1988年12月9日受理)

(原稿)

蓮實文彦*・高野正男・大倉一郎**

1 緒 言

タンパク質の分析法としてよく知られている電気泳動法は, Tiselius¹⁾ 以来種々の改良が行なわれ, 現存ではタンパク質の分析法として欠かせないものとなってきた。とくに Southern²⁾ によって開発されたブロッティング法により, それまではゲル上のみでしか得られなかった電気泳動像が複数の膜上に転写可能となり, 遺伝子工学・免疫化学などの分野への応用が広がった。この転写のさいに使用されるニトロセルロース膜上のタンパク質の分析感度を左右するものの一つに染色法がある。従来染色には, アミドブラック 10B などの色素が用いられていたが, 近年金コロイドの染色液 AuroDye が開発され市販されている³⁾。AuroDye の染色感度は約 0.25 ng/mm^2 でアミドブラック 10B の 400 倍である。今回著者らは, ニトロセルロース膜などに結合したタンパク質に微細な白金コロイドを吸着させ, 吸着した白金コロイドの触媒作用によりタンパク質を銅めっき染色したところタンパク質が高感度で検出できることを見いだしたので報告する。

2 実 験

2.1 白金コロイドの調製

白金コロイドの調製は Turkevich らの方法^{4)~6)}に基づいて行なった。すなわち $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 塩化白金酸水溶液 1 dm^3 を加熱沸騰後 $3.4 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ クエン酸ナトリウム水溶液 0.12 dm^3 を加え 4 時間還流し塩化白金酸を還元した。白金コロイドの平均粒径は 34 Å であった。

2.2 タンパク質の固定と定量

試料タンパク質としては分子量の異なる 3 種類のタンパク質 (卵白アルブミン, SIGMA 社製, ウシ血清アルブミン BSA, SIGMA 社製, カタラーゼ, Combithech 社製) を用いた。各タンパク質を精秤し試料溶液を調製した。本溶液を源液とし 1/10 濃度ごとの希釈列をつくった。これら各濃度のタンパク質溶液をニトロセルロース膜 (NC 膜, BIO-RAD 社製) およびセルロー

スアセテート膜 (CE 膜, 富士写真フイルム製) 上に $10 \mu\text{l}$ 滴下し 30°C で一昼夜乾燥固定した。なお水は水道水を活性炭フィルターおよびイオン交換樹脂で処理した後 2 回蒸留して用いた。

2.3 銅めっき染色

まず, タンパク質を乾燥固定したニトロセルロースあるいはセルロースアセテート膜を白金コロイドに 5 分間浸漬させる。その後蒸留水に 4 分間浸漬放置することにより物理吸着分の白金コロイドを除去した。つぎに銅めっき液 (酒石酸カリウムナトリウム 170 g , 硫酸銅 (II) 五水和物 47 g , 炭酸ナトリウム 30 g , EDTA 2 Na 20 g , 水酸化ナトリウム 30 g を加え水で 1 dm^3 としたもの) の 5 倍容に対し 37% ホルマリン 1 容の割合で調製しためっき浴に, 水洗後の膜を室温で約 5 分間浸漬後ただちに水洗した。

2.4 染色濃度測定

銅めっき染色により得られた結果をビデオカメラとマイクロコンピュータで成る画像処理装置 (イムノメデック社製 TIF-64) を用い染色濃度測定を行なった。

3 結果と考察

3.1 白金コロイド銅めっき染色液のタンパク質検出限界

白金コロイドを用いた本染色法により得られたタンパク質の染色例を図 1 に示す。用いた 3 種類のタンパク質および 2 種類の膜いずれにおいても, タンパク質濃度に対応した染色像が得られた。さらに低濃度のタンパク質について本染色法を実施して得られたタンパク質検出限界を表 1 にまとめた。またそのさいの染色例を図 2 に示す。NC 膜上にタンパク質を滴下した場合, カタラーゼ, BSA, 卵白アルブミンともに 0.1 pg , CE 膜ではカタラーゼ 10 pg , BSA 1 pg , 卵白アルブミン 0.1 pg の検出感度であった。以上の結果から NC 膜を用いた場合では 0.1 pg 以上, また CE 膜を用いた場合でも 10 pg 以上のタンパク質が検出可能であり, Auro Dye 法を用いた場合より 25~2500 倍も高感度で検出できることがわかった。本法は NC 膜および CE 膜いずれにも適用可能であったが, NC 膜を用いた場合により高感度であった。これは, 陽イオン性を帯びた NC 膜の方が, 無極性の CE 膜よりタンパク質の保持に優れているためと考えられる。また CE 膜を用いた場合, 分子量の小さいタンパク質ほどより高感度に検出された。これは分子量の小さいタンパク質ほど単位重量あたりの数が多く, したがってタンパク質の表面積が増加し白金コロイド粒子の吸着可能な面積が大きくなるためと考えられる。

3.2 白金コロイド銅めっき染色法のタンパク質定量性

BSA および卵白アルブミンの種々の濃度について本染色法を実施し, 得られた染色濃度を画像処理装置によって測定した結果とタンパク質濃度との関係を図 3 に示す。卵白アルブミン量

沼津工業高等専門学校工業化学科, 410 沼津市大岡

** 東京工業大学工学部生物工学科, 152 東京都目黒区大岡山

1) A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.*, **33**, 524(1937).2) E. M. Southern, *J. Mol. Biol.*, **98**, 503(1975).

3) Janssen Pharmaceutica 社資料 (1986).

4) J. Turkevich, G. Kim, *Science*, **169**, 873(1970).5) K. Aika, L. L. Ban, I. Okura, S. Namba, J. Turkevich, *J. Res. Natl. Inst. Catal. Hokkaido Univ.*, **24**, 56 (1976).6) 難波征太郎, 大倉一郎, 表面, **21**, 450(1983).

Fig. 1 (a)

Fig. 1 (b)

Fig. 1 (c)

Fig. 1 Detection limit of proteins on CE membrane by using platinum staining method

- (a) Amount of catalase; 1: 1000 ng, 2: 100 ng, 3: 10 ng, 4: 1 ng, 5: 0.1 ng, w: 0 ng
 (b) Amount of BSA; 1: 1000 ng, 2: 100 ng, 3: 10 ng, 4: 1 ng, 5: 0.1 ng, w: 0 ng
 (c) Amount of ovalbumin; 1: 1000 ng, 2: 100 ng, 3: 10 ng, 4: 1 ng, 5: 0.1 ng, w: 0 ng

Fig. 2 (a)

Fig. 2 (b)

Fig. 2 Detection limit of proteins on NC (a) and CE membrane (b) by using platinum staining method

Amount of BSA; 1: 0.1 ng, 2: 0.01 ng, 3: 1 pg, 4: 0.1 pg, 5: 0.01 pg, w: 0 pg

Table 1 Detection limit of proteins by using colloidal Pt staining method

Protein	Membrane	
	NC membrane	CE membrane
Catalase	0.1 pg	10 pg
BSA	0.1 pg	1 pg
Ovalbumin	0.1 pg	0.1 pg

Fig. 3 Relation between color density vs. $\log c$
 ▲: BSA, ○: Ovalbumin

Fig. 4 Effect of pH of colloidal platinum solution
 BSA concentration; 1: 100 ng/10 μ l, 2: 10 ng/10 μ l, 3: 1 ng/10 μ l, 4: 0.1 ng/10 μ l, 5: 0.1 pg/10 μ l, w: water

10~1000 ng の間で染色濃度との間に直線関係があり、BSA においてもタンパク質濃度と染色濃度に相関が認められた。このことから本染色法は、画像処理装置による染色濃度測定を行なうことにより、膜上のタンパク質の定量が可能である。

3.3 白金コロイド銅めっき染色における pH の影響

白金コロイド溶液に $0.2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ HCl-KCl 緩衝液 pH 1.0 を加え、pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 の白金コロイド溶液を調製した。このコロイド溶液を用い、ニトロセルロース膜上に滴下した卵白

アルブミンについて白金コロイド銅めっき染色を行なった結果を図 4 に示す。白金コロイド溶液の pH が 3.0 および 4.0 の場合、より鮮明にタンパク質部分が染色されていることがわかる。これは卵白アルブミンの等電点が $\text{pI}=4.63$ であり、白金コロイド溶液の pH が 4.0 以下で卵白アルブミンが陽イオン性を帯びるため、表面がヒドロキシル基でおおわれ陰イオン性を帯びた白金粒子が結合しやすくなるためと思われる⁴⁾⁶⁾。

Highly Sensitive Protein Detection by Colloidal Platinum Staining Method

Fumihiko HASUMI*, Masao TAKANO and Ichiro OKURA**

*Department of Industrial Chemistry, Numazu College of Technology;
Numazu-shi 410 Japan*

*** Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology;
Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152 Japan*

A highly sensitive staining method for protein detection was developed. In this method colloidal platinum adsorbed on the protein serves as a catalyst for copper plating. By using this method proteins were detected with a sensitivity 25~2500 times higher than that of the Auro Dye method.

~~~~~