〔実験技術〕

両性担体を用いない等電点電気泳動法*

島 尾 和 男**

I. は じ め に

現在広く用いられている等電点電気泳動法 (isoelectric focusing, IEF) はいろいろな等電点 (pI) をもった両性電解質の混合物である“両性担体”を用いて、通電によって自然に生じる pH 勾配 (Rilbe はこれを natural pH gradient と呼んだ) 上の pI と等しい pH の場所に試料が集束することを原理として分離分析が行われている。これに対して、pH の異なる緩衝液界面での相互拡散などを利用して人工的に作った pH 勾配 (Rilbe の artificial pH gradient) に通電して IEF を行うことも試みられたが、通電により pH 勾配が急速に崩れるため一般的に利用されるに至っていない。これについては文献¹⁻³⁾を参照されたい。

1981年に Rilbe は 1 価の弱酸と弱塩基の直線的な濃度勾配を用いれば、通電によっても崩れない pH 勾配ができることを理論的に示し、これを利用する実験法を提案した⁴⁾。筆者は 1982 年に Rilbe の提案した方法を用いなくても、アガロース IEF (Pharmacia) を支持体として人工的な pH 勾配を用いる IEF を実現できることを示したが^{5,6)}、その半年後、東京で開かれた Electrophoresis '83 で、Bier⁷⁾ は自由溶液中での実験法を発表した。

両性担体を用いる IEF は 20 年の実績が示すように大へん優れた方法であるが、両性担体の組成については未知の部分が多く、試料成分との相互作用による諸問題をいつも考慮しておく必要がある。これに対して、人工的な pH 勾配は性質のよく知られた緩衝成分だけで作られることから、試料との相互作用の取扱いが簡単なこと、試薬が安価なこと、両性担体の除去などの前操作なしに蛋白染色を行いうるなどの特長がある。一方、1 価の酸と塩基の組合わせの系しが用いられない

ので、pH 勾配の形は限られたものとなることや、pH 4 以下または 10 以上では、それぞれ H^+ または OH^- イオンの影響で実験が極めて困難であるなどの欠点がある。この種の欠点はあるとしても、特長を活かすことにより利用の分野はかなり広いと考えられるので、原理と実験法を紹介し、2, 3 の実験例を示すことにする。

II. 原 理

電気浸透を示さない支持体 (アガロース IEF ゲル) 中に Fig. 1 に示したような 1 価の弱酸(A)および 1 価

Fig.1. 両性担体を用いない等電点電気泳動法の原理の説明図。

の弱塩基(B)の反対方向の一樣な濃度勾配を作る。ゲルの陽(陰)極端と組成の等しい緩衝液を陽(陰)極液として電流 I を流したとき、ゲル上の任意の位置での A および B の流量 f_A および f_B は次に示すように酸および塩基の種類と電流だけできまり、どこでも一定と

* Isoelectric focusing without carrier ampholytes.

** Kazuo Shimao, 東京医科歯科大学教養部物理学教室。

なるので、通電しても酸と塩基の分布状態は変化しない。A および B のモル濃度を C_A および C_B 、それらの電離度を α_A および α_B とし、完全に電離したときの A および B の易動度の絶対値を U_A および U_B とする。電流による流量は、弱酸については

$$f_A = C_A \times \text{泳動速度} \times \text{断面積} \quad (1)$$

であり、

$$\text{泳動速度} = I \alpha_A U_A / (\text{伝導度} \times \text{断面積}) \quad (2)$$

$$\text{伝導度} = 96.5 (\alpha_A U_A C_A + \alpha_B U_B C_B) \quad (3)$$

$$= 96.5 \alpha_A C_A (U_A + U_B) \quad (4)$$

であるから

$$f_A = 96.5 I U_A / (U_A + U_B) \quad (5)$$

となり、電流 I と易動度 U_A および U_B だけで決まる一定値となり、ゲル内で一定であるのは勿論、電極液中でも、緩衝液の組成、断面積に無関係でどこでも等しい。なお、(3)から(4)に移るとき、 H^+ や OH^- の電荷を無視したときの電気的中性の式 $\alpha_A C_A = \alpha_B C_B$ を用いており、96.5はFaraday定数を1,000で割った数値である。

弱塩基についても同様にして

$$f_B = 96.5 I U_B / (U_A + U_B) \quad (6)$$

が成立つ。(3)から(4)へ移る関係は1価の弱酸と弱塩基の系で、あまり酸性でもアルカリ性でもない系についてしか成立たないことからこの方法の実験条件への制限を生じる。

拡散による流量は濃度勾配と断面積の積に比例するから、支持体中ではどこでも一定でAおよびBの濃度変化を生じない。ゲルの両端では濃度分布の変化が

Table 1. 陽極液及び陰極液の組成

成 分	陽 極 液	陰 極 液
弱 酸	0.225M	0.075M
弱塩基	0.075M	0.225M

弱 酸：酢酸 ($pK_a 4.73$)、モルフオリノエタンスルホン酸 (MES, $pK_a 6.15$)、モルフオリノプロパンスルホン酸 (MOPS, $pK_a 7.2$) などのひとつ。

弱塩基：イミダゾール ($pK_b 6.95$)、トリスアミノメタン (Tris, $pK_b 8.08$)、アメジオール ($pK_b 8.67$) などのひとつ。

生じるが、拡散係数は小さい ($10^{-5} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ 程度) から、2～3時間程度の通電時間ならば、濃度分布の変化はゲルの両端に近い部分だけに留まる。ゲルの各部分はAおよびBの pK 値、それぞれ pK_a および pK_b と C_A 、 C_B からきまる pH を示すので、少量の試料を塗布して通電すれば、試料成分はその pI と等しい pH の部分まで電気泳動してそこに留まることになる。これが両性担体を用いないIEFの原理である。

Table 1 および Fig. 2 に筆者が常用している系の電極液とそれを用いたゲル中の濃度勾配と pH 勾配を示した。

III. 実験条件の概要

1. 濃度勾配ゲル

この実験法の骨子は Fig. 1 のような濃度勾配をも

Fig. 2. いろいろな緩衝液系の pH 勾配。長さ11cmのゲルについてTable 1欄外の pK 値を用いた計算値。

ったゲルの作り方にある。筆者の作り方は Fig. 3 に示したような特別な道具を必要としない方法で、A の濃度 C_{A+} 、B の濃度 C_{B+} ($< C_{A+}$) の楔形の酸性ゲルをまず作り、その上に A の濃度 C_{A-} 、B の濃度 C_{B-} ($> C_{A-}$) の楔形の塩基性ゲルを逆方向に重ねて放置する。楔形のゲル同志の間の A と B の拡散のため、放置すると Fig. 3 の下に示した直線状の濃度勾配を生じる。通電する方向の A、B および水の移動をできるだけ少なくするため、 $C_{A+} + C_{B+} = C_{A-} + C_{B-}$ として、 $C_A + C_B$ が一定値をもつようにしておく、厚さ 1 mm のゲルでは、電算機による模擬実験で、楔形ゲルを重ねてから常温、約 1 時間で様な濃度勾配ができる。

なお、 $C_{A+}/C_{B+} = C_{B-}/C_{A-}$ とすれば pH 勾配は Fig. 2 のようなゲルの中心に対して対称な形になるが、Fig. 3 のようにこの比を変えてもよい。

緩衝液の総濃度 $C_A + C_B$ は緩衝力を保つためには大きいことが望まれるが、余り大きければ電位勾配が小さくなり、実験時間および試料ゾーンの集束度に悪影響を生じる。筆者は Fig. 2 に示した $C_A + C_B \approx 0.04$ 程度のものを用いている。

2. 電極液

通常の容量の電極槽を用いたとき、電解による pH の変化がゲル上に及ばないようにするため、筆者は酸

性ゲルおよび塩基性ゲルの 7 ~ 8 倍の濃度 ($C_A + C_B = 0.3$) の緩衝液をそれぞれ陽極液および陰極液として用いている (Table 1)。

3. 試料の添加

厚手の濾紙 (東洋濾紙 No.526) の小片 (3×4 mm) をゲル上に垂直にのせて放置した後取去ってできたゲルの底に達しない溝に約 $1 \mu\text{l}$ の試料を入れる。予じめ

Fig.3. 濃度 (pH) 勾配ゲルの作り方 (模式図)。

くさび形酸性ゲルの作り方

くさび形塩基性ゲルの作り方

図には描いてないが、ガラス底板、GelBond フィルム、アクリルわくもクリップでとめる。

Fig.4. 濃度 (pH) 勾配ゲルの作り方 (操作法)。

できている pH 勾配の上で電気泳動が行われるので、試料成分間の相互作用なども考慮して溝の位置を決めることが望ましい。広域の pH で血清を分析するときは陰極端につけるのがよいようである。

4. 電気泳動

ゲルと電極液の連絡は厚手の濾紙で行う。Joule 熱による水分のゲル表面からの蒸発はこの実験法の基本的な条件を損うので、ゲル表面および連絡用濾紙の表面をポリエチレンフィルムなどで蔽って通電しなければならない。前述の濃度のゲルで厚さが 1 mm のとき、電流はゲル幅 1 cm 当り 2~2.5mA とする。電位勾配を大きくしてゾーンの分離をよくするため、冷却泳動箱を用い、温度は 10℃ 前後とする。電位勾配は場所により異なるが、平均電位勾配は $20\sim 30\text{Vcm}^{-1}$ であり、両性担体を用いる方法の数分の 1 である。

5. 試料成分の検出

寒天 (アガロース) ゲル電気泳動に用いられている方法を使用する。

IV. 操 作 法

1. 濃度勾配ゲルの作製

Fig. 4 に濃度勾配ゲル作製に筆者が用いている枠などの大きさと作り方を、Fig. 5 にはゲル作製法を含む全操作法を示した。

1) 7.5ml の 1.45% アガロース IEF 溶液 2 本 (酸性ゲル用と塩基性ゲル用) を用意する。筆者は試験管に分注してあるものを用時ヒーティングブロック中で加熱溶解している。

2) 1.2ml の陽 (陰) 極液と 1 滴の pH 指示薬 (例えばブロムフェノールブルー、メチルレッドの各 0.1% アルコール溶液など、泳動状態のマーカーで加えておくと便利、pH 域により指示薬をかえてもよい) をアガロース溶液に加えて混合する。これを酸性 (塩基性) ゲル液ということにする。

3) ガラス底板上に水の薄層で GelBond を密着させ、アクリル枠をおき、陽極となる縁を除きクリップで固定し、陽極方向が少し (約 5 mm/20cm) 高くなるように置く。

4) ガラス蓋板(1)に疎水性フィルムを水の薄層で密着させ、クリップでとめ、ドライヤーで加温する。

5) 酸性ゲル液を枠の陰極側に静かに流し込み、Fig. 4 上図、Fig. 5, B のように疎水フィルム付の蓋板の 1 辺を枠の陰極端の内側にあわせ、他辺を静かに枠

Fig.5. 実験操作説明図。

の陽極側におろすとゲル液は楔状にひろがるので約 10 分放置してゲル化させる。

6) 蓋板(1)のクリップを外し、蓋板の陰極端を押えながらカッターの刃を反対側から、枠の陽極側の縁を押さえるようにガラス板と疎水性フィルムの上にさしこんでガラス蓋板を外す。フィルムの外に溢れたゲルを拭い取る。

7) ガラス蓋板(2)と疎水性フィルムを水層で密着させ、クリップで止め加温する。

8) 酸性ゲル上のフィルムの陰極端を押えながら陽極側からフィルムをはがす (Fig. 5, C)。

9) 枠の陽極側のゲル薄層と枠内のゲルの間にカッターで切目を入れ、枠上の余分なゲルを拭い取る。

10) 塩基性ゲル液を酸性ゲルの陰極側に静かに流しこむ (Fig. 5, D)。

11) 疎水フィルムをつけたガラス蓋板(2)の一边を陰極側の枠にのせ、陽極側を静かにおろすとゲル液が逆方向の楔状に拡がり、全体が一般的な厚さのゲルになる (Fig. 4 下図、Fig. 5, E)。

12) 約 1 時間放置して一様な濃度勾配を形成させる (Fig. 5, F)。約 1 日放置しても使用可能である。

2. 電極槽の用意

電極槽 (内法12(幅)×4(高)×4 cm) に約120ml の電極液を入れ、連絡用の濾紙 (4×11.5cm) を浸しておく。泳動時のゲル面と電極液面の高さの違いは約1.5 cm とし、上記1, 5) がすんだら冷却を始めておく。

3. 試料の添加

上記の1, 6) にならってガラス板と疎水性フィルム

Fig. 6. アメジオール-醋酸系による血清蛋白の泳動像。

上図：濃度勾配の計算値と pH 勾配の実測値。

下図：CBB 染色像 (0.1% の CBB R-250 を含む 30% メタノール/10% トリクロル醋酸中で 30 分固定染色、3% 醋酸で 20 分ずつ 2 回洗浄後、濾紙を重ねて圧迫脱水、乾燥後、35% エタノール/10% 酢酸で洗浄してから乾燥したもの)。

F II : Cohn の F II 分画 (Sigma), 2%.

F II + HSA : F II およびヒト血清アルブミン各約 2%.

IgGmyel. 等 : ミエローマ血清。

C.S. ORTHO : ORTHO Normal コントロール血清。

C.S. Jookoo : 稀常光分画トロール。

Pharm. 3.5-10 : Pharmalyte 3.5-10, 20%.

Serv. 3-10 : Servalyt AG 3-10, 20%.

試料は各約 1 μ l を添加。

2.5 mA/幅 1 cm, 120 分, 14°C で通電。

を外し (フィルムは陰極側から外す), III, 3 の方法で試料を添加し、試料がゲルに浸込んだら、ゲルの陰陽両極端 5 mm を残してゲル表面をポリエチレンフィルムで蔽う (Fig. 5, G, H, I)。

4. 通電

冷却板上にゲルをおき、東洋濾紙 No.526 (4×11.5 cm) 片でゲルと電極液を連絡し、その表面をポリエチレンフィルムで蔽い、数分後、ゲルが冷却してから通電する (Fig. 5, J)。通電は 20 または 25 mA の定電流で行い、通電時間は緩衝液系、試料により異なるが 2 ~ 3 時間である。

5. 染色等

アガロースゲル電気泳動で用いられている方法を用いることができるが、酵素の活性染色等、pH が問題となるときは適当な前処理が必要である。

V. 実験例

1. 血清蛋白質

Fig. 7. Sepaline 3.5-10 によるアガロース IEF 像。

上図：pH 勾配および泳動条件など。

下図：CBB 染色像、図中の試料名については Fig. 6 の説明参照。

Fig. 6はTable 1に示した緩衝液系の中で最もpH域が広いアミノオール-酢酸系を用いたときの血清蛋白の分離像である。上部はゲルを作ったときの濃度勾配の計算値と泳動前および泳動後のゲルpHの1 cmおきの実測値、下部はCoomassie brilliant blue R-250 (CBB) による蛋白染色像である。Fig. 7は同じ試料のSepaline3.5-10を用いたアガロースゲルIEFによる分離像である。泳動終了時のpH勾配の違いを考慮すれば、免疫グロブリン領域以外(pHおよそ6以下)では二つの方法による分離像はほぼ対応した形をとっているように見える。これに対して、免疫グロブリン領域が、両性担体を用いる方法では多数のバンドを示すのに対して、両性担体を用いない方法では全体にひろがった染色像を示し、両者による分離像は全く異なっている。その理由は現在のところ明らかでない。

Fig. 8. トリス-酢酸系による血清蛋白の泳動像。

上図：濃度勾配の計算値とpHの実測値。

下図：CBB R-250染色像(染色法はFig. 6と同じ)。

β-Glob, Alb, FII: Sigmaのヒト血清β-グロブリン、アルブミンおよびFII。

ON, ON': ORTHO Normal コントロール血清。

OEL: ORTHO Elevated Lipid コントロール血清。

H: ヘキストコントロール血清。

実験条件などは図中に示した。

pH 6より酸性部分を拡大分離するための、トリスと酢酸のゲル中心に対して非対称な濃度勾配を用い、CBB染色によりえられた血清蛋白像をFig. 8に、同じ条件で泳動後、免疫固定法によりいくつかの成分の所在を見た結果をFig. 9に示した。トランスフェリン(Tf), α₁-アンチトリプシン(α₁-AT), 補体成分C3c, Gc-グロブリンなどがpIの異なる成分として等電点に集束していることが示されている。

2. 両性担体

これまで両性担体がどんな成分を含むかについては、合成法からの推測が行われてきたが、実験的に成分を分析することはなされていないようである。両性担体を用いないIEFにより、両性担体の成分がどんな分離像を示すかをみたのがFig. 10である。広域(pH 4.5-8.5)およびその中央域(pH 5-8)を示すトリス-酢酸系、中性~弱アルカリ性域(pH 6-9)のアミノオール-MES系を用いてIEFを行い、0.4%のポン

Fig. 9. 免疫固定法による血清蛋白分画の泳動位置の検出。

Fig. 8の試料ONの3倍稀釈液につき、Fig. 8と同じ条件で泳動した後、DAKO抗血清を用いて免疫固定(セルロースアセテート膜に含ませた抗血清を用いる常法による)してハプトグロビン(Hp), α₁-アンチトリプシン(α₁-AT), Gcグロブリン(Gc), トランスフェリン(Tf), 補体成分C3c, α₂-マクログロブリン(α₂-M), ヘモペクシン(Hpx), および免疫グロブリンG(IgG)の泳動位置を検討したもの。

Fig.10. 両性担体 (Ampholine3.5—10などおよび Sepaline3.5—10) の泳動像。

左：トリス-酢酸系 (pH4.5—8.5)，中央：トリス-酢酸系 (pH 5—8)，右：アメジオール-MES 系 (pH 6—9)。

上図：濃度勾配の計算値と pH の実測値，下図：ボンソー 3 R 染色像。染色法は本文参照。試料，泳動条件などは図中に記した。同一両性担体について，濃度 (5，10または20%) または塗布量 (0.4—1.5 μ l) を変えて泳動してある。

ソー 3R を含む10%のトリクロロ酢酸で両性担体成分を固定染色してえたものである。両性担体成分のすべてが固定染色されていることは確認されていないが，両性担体成分の IEF による分離が行われていることは確実と思われるので，固定染色法を工夫することにより，両性担体の種類やロット差による分離像の違いの解釈や，両性担体製造のときの品質管理などに利用することができると思われる。なお，上述の両性担体の固定染色法は Pharmalyte や Servalyt に対しては不適當である。

VI. お わ り に

両性担体を用いない IEF という新しい実験法を説明し，2，3の実験例を示した。この方法の骨子は，弱酸と弱塩基の逆方向の様な濃度勾配を電気浸透を示さないゲル中に作ることにある。特別な道具を用いない方法として，筆者は楔形のゲルを重ねる方法を使っているが，10%程度の蔗糖などの共存は支障を与えないと思われるので，グラジェントミキサーを用いて作った濃度勾配ゲルを用いることも可能であろう。そうすれば，拡散の時間は不要で，ゲル化後直ちに泳動

することができるだけでなく，pH 勾配の再現性も改良されるであろう。実験例からも予想されるように，この方法は用い方によって広い応用範囲をもつ可能性がある。読者諸氏の参考になれば幸である。

文 献

- 1) Haglund, H. : Meth. Biochem. Anal., **19**, Ed. Glick, D., Wiley, Interscience, 1971, pp. 1—104.
- 2) Righetti, P. G., Drysdale, J. W. : Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol., **5**, II, Ed. Work, T. S., Work, E., North-Holland Pub. Co., Amsterdam, 1976, pp.337—590.
- 3) Kolin, A. : Electrophoresis, **4** : 1, 1983.
- 4) Rilbe, H. : Electrophoresis, **2** : 261, 268, 1981.
- 5) 島尾和男 : 生物物理化学, **26** : 283, 1982.
- 6) Shimao, K. : Electrophoresis '83, Ed. Hirai, H., Walter de Gruyter, Berlin, 1984, pp.555—558.
- 7) Bier, M. et al. : Electrophoresis '83, Ed. Hirai, H., Walter de Gruyter, Berlin, 1984, pp.99—107.