PAGIEF ゲルの両面からニトロセル ロース膜への蛋白の転写(両面転写)*

大上 治・中村茂基・阿部和枝**

SUMMARY

A new method has been devised for the electrophoretic transfer of proteins from the PAGIEF gel to a pair of nitrocellulose membranes which placed on the both sides of the gel. With repeatedly changing over the polarities of electrodes of the apparatus in accordance with the timetable, this method enabled to equally transfer the proteins to a pair of nitrocellulose membranes simultaneously. Furthermore, it was possible to equally quantitatively transfer the proteins of molecular weight about 50,000~120,000 to two pairs of nitrocellulose membranes.

The results indicate that the both-sides blotting is applicable in the studies of genetic polymorphism of plasma proteins and identification of protein antigens following two-dimensional gel electrophoresis.

Key words : both-sides blotting, polyacrylamide gel isoelectric focusing, genetic polymorphism, electroblotting, plasma protein.

はじめに

遺伝子工学分野では、DNA や RNA を泳動後のゲルからニトロセルロース膜上に毛細管現象を利用して転写させ、固定化した DNA や RNA を *in situ* のハイブリット形成によって解析するいわゆる Southern 法 (1975)¹⁾ および、Northern 法 (1977)²⁾ がよく知られているが、Southern の報告以来、これらの方法は核酸だけでなく蛋白質抗原にも応用されている³⁾。さらに Towbin ら (1979) は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後のゲルから蛋白質抗原をニトロセルロース膜上に電気的に転写し、特異抗体を用いた酵素抗体法により抗原を検出できることを示した⁴⁾。近年になりこれらの方法は特異性が高く、しかも高感度の検出が可能であるところからさまざまな研究

に利用されつつある⁵⁻⁸⁾。

一方、ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動 (PAGIEF) 後のゲルよりニトロセルロース膜に蛋白を電気的に転写し、酵素抗体法により検出を行う方法は血漿蛋白成分の遺伝的多型の検索などに有用であることが示されているが⁹⁻¹¹⁾、さらに著者らはこの方法を発展させ、PAGIEF 後のゲルの両面にニトロセルロース膜を添付し、同時に両面に蛋白を転写する方法を考案し検討を行ったところ良好な結果が得られた。そこでこの両面転写法の実際について述べると共にその実験例についてもあわせて報告する。

実験方法

1. 試料

血液試料は健康人男女より採取した EDTA 血漿を

* "Both-sides Blotting" electrophoretic transfer of proteins from the both sides of PAGIEF gels to nitrocellulose membranes.

** Osamu Ohue, Shigeki Nakamura and Kazue Abe. 東京女子医科大学 法医学

Correspondence address : Osamu Ohue, Department of Legal Medicine, Tokyo Women's Medical College, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan.

(受付 1985年5月18日, 受理 1985年8月26日)

用いた。

2. PAGIEF

電気泳動装置は LKB 2217 Ultrophor system および LKB 2297 Macrodrive 5 Constant Power Supply を用いて行った。ポリアクリルアミドゲルは、 $240 \times 110 \times 0.5\text{mm}$ のものを厚さ 1.0mm のガラス板上に作製した。ゲル組成は以下に示した。

29.1%	acrylamide	3.5ml
0.9%	N,N'-methylene bisacrylamide	3.5ml
1.0%	ammonium persulphate	0.5ml
pH3.5~9.5	Ampholine (LKB 1818)	1.5ml
	distilled water	12.0ml

電極液は陽極側に $1\text{M H}_3\text{PO}_4$ 、陰極側に 1M NaOH を用い、constant power 25W で90分間、 4°C で泳動を行った。

3. ニトロセルロース膜への両面転写法

転写方法の概略を Fig. 1 に示した。まずあらかじめ適当なサイズに揃えた2枚のニトロセルロース膜 ($0.45\mu\text{m}$, S & S, W, Germany), Whatman 3MM ろ紙, およびパットを転写用緩衝液 (25mM Tris , 192mM glycine , 20% vol/vol methanol, $\text{pH}8.3$) に充分浸しておく。なお2枚のニトロセルロース膜には、陽極、陰極, およびゲルのどちら側に添付したかがわかるように印を付けておく。

PAGIEF 後, 直ちにゲルの両面にニトロセルロース膜を添付するわけであるが, まず1枚目のニトロセルロ

ース膜をゲルの泳動両側に添付し Whatman 3MM ろ紙を重ねた後, ゲルをガラス板より外し裏返して再びガラス板上に置く。次に2枚目のニトロセルロース膜をゲルのガラス面側に添付しさらに Whatman 3MM ろ紙を重ねた後これをパットで挟んでゲルの泳動面が陰極側になるように泳動槽 (KS-8440 GMT 型, マリソル産業) に装着した。電気泳動は 500mA , 4°C で Fig. 1 に示した時間通りに電極の極性を交互に切り換えながら 52.5 分間行った。すなわち, まずゲルのガラス面側に添付したニトロセルロース膜に転写されるように1分間泳動を行い (A 方向), 次に電極の極性を切り換えて泳動面側に添付したニトロセルロース膜に転写されるように 1.5 分間泳動を行った (B 方向)。以後電極の極性を切り換えるごとに泳動時間を 30 秒ずつ増加して, B 方向に 5.5 分まで行き, さらに両方向に 10 分ずつ行った。

泳動終了後, 2枚のニトロセルロース膜を蛋白染色し, デンシトメトリー (610nm) を行った。デンシトメーターは GELMAN ACD-18 GELMAN を用い, スリット幅 $0.1 \times 2\text{mm}$ にてスキャンを行った。

実験結果

1. 両面転写した2枚の転写膜の比較

Fig. 1 に示した条件設定は著者らが考案したものであるが, Fig. 2 にこの条件によって得られた2枚の転写膜をアミドブラック 10B (C, I, 20470) により蛋白染色

Fig. 1. Assembly and sequential procedures for the equally transfer of proteins from PAGIEF gel to a pair of nitrocellulose membranes.

Fig.2. Comparison of electrophoretic patterns of plasma protein obtained by both-sides blotting and PAGIEF.

(1) and (2): Both-sides blotting patterns of plasma protein on nitrocellulose membranes stained with Amidoblack 10B.

(3): PAGIEF patterns of plasma protein stained with coomassie brilliant blue R-250.

(4): PAGIEF gel after both-sides blotting stained with coomassie brilliant blue R-250.

した際の泳動像を示した。さらにその比較として転写前後のポリアクリルアミドゲルをコマシーブリリアントブルー R-250 (C.I.42660) で蛋白染色したものも同時に示した。

2枚のニトロセルロース膜への転写状態は Fig.1 に示した転写方法で行う限り、ほぼ均等に転写が行われていることが認められた。また、転写前後のポリアクリルアミドゲルの蛋白の状態からも、ほとんどの蛋白成分は52.5分間の転写時間で2枚のニトロセルロース膜上へ移行していることが認められた。

2. デンシトメトリーによる比較

さらに両面転写により得られた2枚のニトロセルロース膜における蛋白成分の転写状態をデンシトメーターを用いて比較検討した。Fig.3にそのデンシトグラムを示した。それぞれのピークは一致しており、蛋白量もほぼ均等に転写されたことが認められ、したがって本法は定量性も高いことが示された。

3. 4枚転写への応用

Fig.1に示す転写方法で行うことにより1枚のポリアクリルアミドゲルから2枚のニトロセルロース膜に蛋白を均等に転写することが可能となった。この結果をさらに発展させ、1枚のゲルより2組計4枚のニトロセルロース膜に均等に蛋白を転写することを試み、そして

Fig.3. Densitogram of transferred plasma protein on a pair of nitrocellulose membranes.

得られた転写時間を Fig.4に示した。ニトロセルロース膜をゲルに添付する方法は Fig.1に示した両面転写と同様に行い、転写時間は電極の極性を Fig.4に示したごとく30秒ずつ増加しながら切り換えて計7分間行った。そして1組目のニトロセルロース膜をゲルより外し、2組目のニトロセルロース膜を添付し、1組目と同様な操作で52.5分間行った。この転写時間により得られた2組計4枚の転写膜をアミドブラック10Bで蛋白染色したものが Fig.5-(1)である。4枚のニトロセルロース膜上にはすべての蛋白分画が転写されていることが認められた。

4. 4枚転写を用いた実験例

PAGIEF 後のゲルより4枚の転写膜を得ることにより4種の血漿蛋白型の検出を試みた。検出した血漿蛋白型は C6, C7, factor XIII A, factor XIII B であるが、ニトロセルロース膜からの検出法はそれぞれ特異的抗血清を用い、すでに報告した方法¹⁰⁾により行った。なお今回はニトロセルロース膜への転写後、膜上に存在する非特異的な蛋白結合部位を完全にブロックするために

A (min)	Direction of transfer	B (min)
1	←	
	→	1.5
2	←	
	→	2.5

A (min)	Direction of transfer	B (min)
1	←	
	→	1.5
2	←	
	→	2.5
3	←	
	→	3.5
4	←	
	→	4.5
5	←	
	→	5.5
10	←	
	→	10

Fig.4. Timetable in order to transfer the proteins from PAGIEF gel to two pairs of nitrocellulose membranes.

Fig.5. Both-sides blotting from PAGIEF gel to two pairs of nitrocellulose membranes.

- (1): Comparison of electrophoretic patterns of the plasma protein on two pairs of nitrocellulose membranes stained with Amidoblack 10B.
 (2): Application for the detection of blood groups of plasma protein. (A): sixth component of complement (B): seventh component of complement (C): coagulation factor X III A subunit (D): coagulation factor X III B

通常用いられる牛アルブミンに代えて3%ゼラチン-PBS (pH7.2) を用いた。しかし結果には差は認められず、経済的であった。Fig.5-(2)に本法により得られた4種の血漿蛋白型の泳動像を示したが、各型とも明瞭に検出することができた。しかし、本法には高感度であるため、沈降反応により特異性が検定されている抗血清を1次抗体として用いる限り、多少の交差反応は免れない。実際、今回検出を行った4種の血漿蛋白型においても、明らかに目的蛋白以外の蛋白質との交差反応によると考えられるバンドが出現したが、タイピングに影響はなかった。

以上の結果、本法を用いることにより1枚のゲルより同時に4種類の血漿蛋白型の検出が可能なが示された。

考 察

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は分子量の測定など蛋白質解析の有力な方法であるが、その反面 SDS により蛋白が変性を起し、特異的抗血清による検出ができないという欠点をもつ。そこで SDS を結合した蛋白をニトロセルロース膜上に電気的に転写することにより SDS を除き、再常態にした蛋白を特異的抗血清により検出する方法 (Western blotting) が開発され各分野で利用されている⁶⁻⁸⁾。一方ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動 (PAGE) 後のゲルより蛋白をニトロセルロース膜に電気的に転写し特異的抗血清を用いて検出を行う方法は Immunofixation 法¹²⁾につぐ新しい検出法として血漿蛋白成分の遺伝的多型の解析などに利用されつつある⁹⁻¹¹⁾。

今回著者らは、両面転写の検討に際して血漿蛋白の PAGE を行ったわけであるが広範囲の蛋白分画について検討を行うためにゲルの pH 範囲を pH3.5~9.5 とし、また転写用緩衝液には比較的汎用されているトリス・グリシン・メタノール (pH8.3) を用いた。

まず両面転写を行うことにより均等な2枚の転写膜を得る諸条件について検討を行った。ニトロセルロース膜の添付に際しては、始めにゲルの泳動面側に行い、ついでゲルを裏返してガラス面側に行ったわけであるが、その添付時の蛋白の転写状態を比較するために蛋白染色したところ、始めに添付したゲルの泳動面側のニトロセルロース膜に多く蛋白が吸着されていた。こ

れは膜添付時から毛細管現象により膜上へ蛋白の移行が始まり、またその吸着が比較的速いために生じる誤差である。そこで蛋白転写においては、膜の添付時とは逆にゲルのガラス面側のニトロセルロース膜から転写を開始し、さらにここで1分間の泳動を行うことにより誤差の解消ができた。またニトロセルロース膜に蛋白を電気的に転写を行う際、蛋白は分子量により転写速度が異なることを考慮した上で、電極の極性を切り換えるごとに30秒ずつ時間の増加をし、5.5分まで行うことによりほとんどの蛋白分画の転写が認められ、さらに両極に10分ずつ泳動を行うことにより完全な転写が得られた。Fig.2は Fig.1の設定時間で得られた泳動像および転写前後のポリアクリルアミドゲルであるが、これを比較検討したところ、分子量に拘わらずすべての蛋白が転写されていることが認められた。ただし血漿蛋白の主体を占めるアルブミン分画の一部が転写後のゲル中にまだ僅かに残存していた。

次に1枚のゲルより定量性を考慮した均等な多数枚の転写膜を得ることを検討した。従来の方では、片面より多数枚の転写膜を得て、多種の蛋白の検出を行っている報告もあるが¹³⁾、蛋白質は分子量により転写速度が異なるためこの方法では均等な転写膜を得ることは不可能である。両面転写を用いて得ることのできる均等な転写膜は検討の結果2組計4枚であった。Fig.4にはこの4枚転写のための転写時間を示した。この設定時間は Fig.1に示す設定時間を基にして検討を行った。まず、7分後に1組目の泳動を終了し、さらに2組目を Fig.1に示す設定時間で行った。そして Fig.5-(1)にその泳動像を示した。計59.5分の泳動時間ですべての蛋白分画が転写されていた。しかし低分子蛋白から高分子蛋白まで均等に転写するためにはまだ研究の余地があるが、分子量5万~12万位の蛋白については、Fig.4の泳動時間を用いることによりほぼ定量性のある均等な4枚の転写膜を得ることが可能であった。しかし個々の蛋白成分についていえば分子量に拘わらず検出が可能であるところから、Fig.5-(2)の実験例に示したように著者らはこの4枚転写を血漿蛋白型多型の検出に応用している。また本法は SDS-PAGE を用いての蛋白質解析にも非常に有用性が高いと考えられ、さらに転写用緩衝液の pH に拘わりなくゲル中に存在する蛋白を均等に両面転写することが可能であるため、この得られたシンメトリーな転写膜を2次元泳動による蛋白の同定などにも応用可能であると考えられる。

本論文の要旨は第35回電気泳動学会総会にて報告した。

結 論

ポリアクリルアミドゲル等電点電気泳動(PAGIEF)後のゲルの両面に添付したニトロセルロース膜に蛋白を同時に電氣的に転写する新しい方法を考案した。本法は経時的に電極の極性を交互に切り換えることにより、ゲルの両面に添付した1組のニトロセルロース膜に蛋白を同時に均等に転写することを可能にした。さらに分子量約50,000~120,000の蛋白については2組のニトロセルロース膜に定量性のある均等な転写も可能である。

これらの結果より、両面転写は、血漿蛋白の遺伝的多型の検索や2次元電気泳動による蛋白の抗原の同定にも応用可能であると考えられる。

文 献

1) Southern, E.M. : J. Mol. Biol., **98** : 503, 1975.

- 2) Alwine, J.C. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74** : 5350, 1977.
- 3) Renart, J. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76** : 3116, 1979.
- 4) Towbin, H. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76** : 4350, 1979.
- 5) Bittner, M. et al. : Anal. Biochem., **102** : 459, 1980.
- 6) Burnette, W.N. : Anal. Biochem., **112** : 195, 1981.
- 7) Gregori, C. : Ann. Hum. Genet., **46** : 281, 1982.
- 8) Battle, J. : Br. J. Haematol., **55** : 195, 1983.
- 9) Whitehouse, D.B. and Putt, W. : Ann. Hum. Genet., **47** : 1, 1983.
- 10) Nakamura, S. et al. : Hum. Genet., **66** : 279, 1984.
- 11) Nakamura, S. et al. : Hum. Genet., **68** : 138, 1984.
- 12) Alper, C. A. and Johnson, A.M. : Vox. Sang., **17** : 445, 1969.
- 13) 高橋裕子他 : 生物物理化学, **28** : 183, 1984.