〔テクニカルノート〕

アガロースゲル等電点電気泳動実験法の改良

島尾和男*

1. はじめに

両性担体を用いるゲル等電点電気泳動法(IEF)ではいわゆる波打ち現象やゲル表面への緩衝液の浮き出しなどが分離像に悪い影響を与えるので、これを防ぐため色々な工夫が行われているが¹⁻³⁾、確実に防ぐことは困難なようである。私は以下に述べる簡単な方法を用いることによって、アガローゲスル IEF で殆どこれらの現象が生じないことを経験してきているので、ゲル IEF を用いている人々に参考になればと考えてその実験法を発表する。

2. 実験法

1) アガロースゲルプレート 8g/dl のソルビトールを含む1.4g/dl のアガロース IEF (Pharmacia Fine Chemicals) 溶液6.0ml (70℃) に0.7ml の20g/dl セパライン3.5-10 (70℃) (富士写真フイルム㈱) を加えてよく混合し、ガラス板の上に水で貼り付けた GelBond film (102×75mm, Marine Colloids Division, 日本

商事㈱扱い) の上に流してゲル化させたものを用いる。

2) 試料の添加 3×4 mm の東洋濾紙No526 を4 mm の縁でゲル表面に立てて約1分おいてから取り除いた跡にできた溝に針付き毛細ピペットで試料を入れる。75(102) mm の方向の通電では血清の場合、約0.5 μl を陰極端から1(2) cm に作った12(8)個の溝に入れる。

3) 泳動箱と通電法 セルロースアセテート膜電気泳動法用のごく普通の泳動箱(㈱常光238型等)を用い、陽極側には約200ml の1M磷酸、陰極側には約200ml の0.1M水酸化ナトリウムを電極液として注ぎ、スポンジを置いて電極液を含ませ、アガロースゲルプレートをゲル面を下にして両端約5 mm をスポンジに載せる。陰極液に炭酸ガスを吸収させないようにするため、泳動箱のなかにはソーダライムを入れて置く。蓋の上には-16℃の冷凍庫に入れて冷却して置いたアイスノンソフト(㈱白元、大きさ約、27×17×3cm)を置き10分後に通電を始める。75(102) mm 方向の通電は250(300) V の定電圧で50(80) 分行う(Fig. 1 参照)。室温によ

Fig. 1. Electrophoresis vessel for agarose gel IEF.

An improved procedure of agarose gel isoelectric focusing.

*Kazuo Shimao, 東京医科歯科大学教養部物理学 Laboratory of Physics, Department of General Education, Tokyo Medical and Dental University, Ichikawa-shi 272, Japan

略号: IEF, 等電点電気泳動法; PAG, ポリアクリルアミドゲル; SSA, スルフォサリチル酸; TCA, トリクロル酢酸; CBBR250; コマジープリリアントブルー R 250, C.I.No.42660.

(受理 1986年10月29日)

(38) 生物物理化学

り異なるが、電流のこの間の変化の例を Fig. 2 に示した。

4) 蛋白質の染色法 Pharmacia Fine Chemicals のパンフレット (52-1536-01) に準じて 5 g/dl SSA+10 g/dl TCA で15分固定, 35%エタノール+10%酢酸で15分洗浄 2 回, 東洋濾紙No.2, 8 枚を用いて10分間圧迫脱水, ドライヤーで乾燥後, 洗浄液に CBBR250 を 0.1% に溶かした染色液で10分間染した後, 洗浄液で約 3 分間洗浄する。

Fig. 2. Electric current in the course of IEF under constant voltage.

Length of the gel slab: A: 75 mm, B: 102 mm

3. 結果と考察

Fig. 3 に 75mm, Fig. 4 に 102mm の方向に通電した時にえられた泳動図の例を示した。多数回の実験をしたが波打ち現象や水の浮き出しは殆ど生じなかった。この方法の要点は 1.3% というやや高濃度のアガロースゲルを用いることとゲルを下に向けてスポンジを介して電極と接続すること, 及び蓋の上から冷却することにある。従って, いろいろな種類の両性担体や PAG を用いた場合にも, 適当な通電条件を選べば波打ちや水の浮き出しを防ぐことができると思われる。詳しい議論は省略するが, 定常的 IEF の理論⁴⁾から考えると, 最終電圧を余り高くすることは避けるべきであることから, 常法とは異なり, 定電圧通電を行い, 且つ, 電圧が常法よりかなり低い。えられた分離像は定電圧かつ低電圧でも良好な結果がえられることを示している。

Fig. 3. IEF pattern on a gel slab 75 mm long.

- 1, 2: Normal control serum (ORTHO)
- 3, 4: IgG myeloma serum
- 5, 6: IgA myeloma serum
- 7, 8: IgM myeloma serum
- 9, 10: Human FII (SIGAM)
- 11, 12: Anti-WHS rabbit serum (Hoechst)

Fig. 4. IEF pattern on a gel slab 102 mm long.

- 1, 2: Normal control serum (ORTHO)
- 3, 4: IgG myeloma serum
- 5, 6: IgA myeloma serum
- 7, 8: Anti-WHS rabbit serum (Hoechst)

終わりに

ゲル IEF の実験での電極及びゲルとの接続, 冷却に工夫を加えて, アガロースゲル IEF で良い結果がえられた. この方法, 特に電極との接続法は PAGIEF にも応用できると思われるので試みてもらいたいと考え実験法を発表した.

文 献

- 1) 馬場 巽, 他: 生物物理化学, **26**: 341, 1982.
- 2) 小林貞男, 他: 生物物理化学, **30**: 97, 1986.
- 3) 山岸安子, 他: 生物物理化学, **30**: 119, 1986.
- 4) 島尾和男: 生物物理化学, **26**: 334, 1982.