〔実験講座シリーズ〕

2次元親和電気泳動法

竹尾和典・中村和行・鈴野亮輔・田中経彦・三村雄輔

原理と目的

抗原刺激によって生成し血清中に出現する抗体は高度に不均一である。単純な構造をもつハプテンに対する抗体であっても同様である。このような不均一抗体をそれぞれの均一抗体に分離することは抗体の不均一性とその蛋白質構造および抗原結合親和性との関係を解明するために必要であるだけでなく、癌化等の病変の抗体産生に及ぼす影響を検索するためにも必要な事項である。

これまで、抗体の分離のために等電点電気泳動法(IEF)^{1,2)}や、いわゆる2次元電気泳動法^{3,4)}の適用が報告されているが、不均一抗体の分離は十分でない。そのために、抗体の不均一性の研究はおもにハプテンに親和性をもつミエローマー蛋白質、あるいは、細胞融合によって調製された単クローン性抗体の分析に負っている⁵⁾。しかし、これらの抗体試料は不均一抗体を構成する多クローン性免疫グロブリンの一部を分析したにすぎず、その研究から抗体産生の全体像を明らかにすることは困難である。

抗体のように、ほぼ同一の分子量をもった蛋白混合試料の分離を試みる場合に、一次元目にはIEF、二次元目には親和電気泳動法(AEP)を利用し、抗体分子を等電点と抗原結合親和性の両面から分離することは有効である。われわれはこの新しい2次元電気泳動法を二次元親和電気泳動法(2D-AEP)⁶⁻¹⁰⁾と呼び、その開発・応用に努めている。すなわち、ウサギ抗DNP-抗体は一次元目に毛細管式-IEF、二次元目にセミ・マイクロ平板式-PAGによるAEPを行うことによって、数百のIgG-分画に分離された。その特徴的な分離像(2次元親和電気泳動像)から、これら多数の抗-DNP IgGスポットは親和

性は同一であるが、pIの異なる数個(5~8個)のIgGスポットからなるIgG-集団に組み分けられ、それらのIgG-集団のそれぞれが、同一のクローンに由来するIgGであると推論した^{8,9)}。このように2次元親和電気泳動法は不均一抗体の完全分離を可能にする泳動法であるといえる。

本実験操作法では2D-AEPによるウサギ抗DNP-抗体の分離を中心に抗Dansyl-抗体の分離と、これら抗体のハプテン間の交差反応の検出法について、その操作法を述べる。

操 作 法

I. 親和クロマトグラフィーのための親和担体, 2D-AEPのための親和リガンド, ハプテン-抗原, および抗ハプテン-抗体の調製

I.1 親和担体: ハプテン結合リジン・セファロース

1) ε-N-ジニトロフェニール・リジン・セファロース (DNP-セファロース)

あらかじめ、よく水洗したリジン・セファロース-4Bビーズをなす形フラスコに採り、後で加えるジニトロベンゼン・スルホン酸(DNBS)の2当量のK₂CO₃を加え、吸引することなしにロータリー・エバポレーターを回転させながら、リジン・セファロースのリジン残基の10当量に相当するDNBSを加え、室温一昼夜、回転・攪拌する。セファロース・ビーズはガラス濾過器上で十分水洗する。調製されたDNP-セファロースは0.02% NaN₃含有PBS(1.09g KH₂PO₄, 4.31g Na₂HPO₄・12H₂O, 9.0g NaCl, 水を加えて1L)にサスペンズし、遮光して4°Cにて貯蔵する。

2) ε-N-ダンシル・リジン・セファロース (Dansyl-

Two-dimensional affinity electrophoresis.

Kazusuke Takeo, Kazuyuki Nakamura, Ryousuke Suzuno, Tatehiko Tanaka, Yusuke Mimura; 山口大学医学部生化学第一講座

Correspondence address: Kazusuke Takeo, Department of Biochemistry I, Yamaguchi University School of Medicine, 1144, Kogushi, Ube 755, Japan.

(2) 生物物理化学

セファローズ)

水洗リジン・セファローズ・ビーズを 1% NaHCO_3 のサスペンションとし、なす形フラスコに採り、ロータリー・エバポレーターを回転・攪拌しながら、リジン残基の 2 当量のダンシル・クロリッド・アセトン溶液を滴下し、室温一昼夜、回転・攪拌する。セファローズ・ビーズはアセトン-PBS, 1:1 (v/v) 溶液にて十分洗浄した後、0.02% NaN_3 含有 PBS-サスペンションとして遮光して 4°C にて貯蔵する。

I.2 親和リガンドの調製

親和電気泳動法に用いられる高分子親和リガンドはメチレンビスアクリルアミド (BIS) を用いずに非架橋・水溶性アクリルアミド-アリアルアミン共重合体 (A-A 共重合体) を調製し、アリアルアミン残基のアミノ基にハプテンを結合させて調製した。

1) A-A 共重合体の調製

40 g のアクリルアミドと 4 g のアリアルアミンとを 500 ml の三角フラスコに採り、400 ml の無イオン水を加えて溶解させ、水溶中で 30°C に加温した後、0.8 ml N,N,N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) を加え、直前に調製した 0.8% の過硫酸アンモニウム水溶液 50 ml を加えて、よく混和した後、混液の表面に水を重層させ、30°C 一昼夜、静置さす。反応混液は 3 日間、流水に対して透析した後、約 100 ml まで減圧濃縮し、次いで、2 日間、6 時間毎に交換しながら、無イオン水に対して透析する。

2) A-A 共重合体のニトロフェニル化: DNP-PA の調製

1) 項で調製した A-A 共重合体・水溶液を 250 ml の三角フラスコに採り、4.5 g NaHCO_3 を溶解させ、攪拌しながら、15 ml のアセトンに溶解させた 4.8 g ジニトロフルオロベンゼン (DNFB) を滴下する。室温で一昼夜攪拌した後、流水に対して 5 日間、透析し、沈殿物を遠心除去し、約 100 ml に減圧濃縮し、次いで、無イオン水に対して 6 時間毎に交換しながら、2 日間、透析する。

DNP-PA の DNP-基の濃度は 0.1 N NaOH における 360 nm での DNP-グリシンの分子吸光度が 17,530 である¹¹⁾のを利用して分光的に測定する。

3) A-A 共重合体のダンシル化: Dansyl-PA の調製

1) 項にしたがって調製した別の A-A-共重合体溶液 (約 100 ml) を 1 l の三角フラスコに採り、2% NaHCO_3 水溶液 100 ml を加え、よく混和し、ゆっくり攪拌しな

がら、200 ml のアセトンに溶解したダンシル・クロリッドを滴下する。一夜室温にて攪拌した後、80% の濃度にアセトン (約 600 ml) を加え、上清を除去し、沈殿を少量の水に溶解させ、再び 80% の濃度にアセトンを加える。アセトン-水による沈殿・溶解操作を 3 回、繰り返した後、無イオン水に対して十分透析する。

Dansyl-PA 溶液のダンシル-基の濃度は pH 7.5 における 330 nm での分子吸光度が 4.47×10^3 であるとして分光的に測定する¹²⁾。

I.3 ハプテン-抗体: ハプテン-担体蛋白・共重合体の調整

担体蛋白のジニトロフェニル化は I.1 1) 項のリジン・セファローズの場合と同様にその蛋白質のリジンおよびチロシン-残基量と当量の DNBS を K_2CO_3 -弱アルカリ下で作用さす方法である。反応溶液は室温にて一夜遮光・攪拌し、PBS に対して十分透析した後、0.02% NaN_3 含有 PBS 溶液として、4°C に遮光して貯蔵する。

DNP-ニワトリ血清アルブミン-抱合体 (DNP-CSA)、DNP-ヒト- γ -グロブリン-抱合体 (DNP-HGG) の担体蛋白の平均分子量当りの結合 DNP-数は DNP-CSA で 25、DNP-HGG で 35 であった。

担体蛋白のダンシル化はその蛋白質の 2% NaCO_3 溶液をゆっくり攪拌しながら、その蛋白質のリジン残基と当量のダンシル・クロリッドのアセトン溶液を滴下し、室温にて一夜、遮光・攪拌し遠心上清を PBS に対して十分透析した後、0.02% NaN_3 含有 PBS-溶液として冷・暗所に貯蔵する。

I.4 抗ハプテン抗体の調製

1) 抗 DNP-抗体⁸⁾

ウサギ抗 DNP-抗体は数回の過剰感作によって得られた抗血清の硫酸沈殿法による部分精製と DNP-セファローズ/DNP-グリシンによる親和クロマトグラフィーによって精製した。この操作によって得られた抗 DNP-抗体は SDS-PAGE, Ouchterlony 二重拡散法、免疫泳動法、および、2次元親和泳動像等の結果から、ほとんど IgG-クラスの免疫グロブリンからなる抗体標品であったが、試料によっては、IgM-クラスの免疫グロブリンをわずか (1% 以下) 含んでいた。

感作: 5 mg の DNP-CSA または、DNP-HGG (約 0.5 ml) と同量の完全フロイド・アジュバンド (CFA) の混液のエマルジョンを 4 週ごとに、ウサギ背部皮肉の数カ所に注入感作する。抗 DNP-抗体の血清濃度は、一般に 3 回目の感作以後は 1~2 mg/ml の値でほぼ一定の濃度に達する。

部分精製：その時点で頸動脈より採血し、遠心分離して血しょうを採取する。以後の操作はフィブリンの析出を防ぐために、1 mM の EDTA を含む状態で行う。採取した血しょうをゆっくり攪拌しながら、アンモニアで pH を 7.4 に補正した飽和硫酸液の同量を滴下し、室温に 2 時間静置した後、遠心分離し、その沈殿物を少量の 1 mM EDTA 液 (pH 7.4) に溶解し、1 mM EDTA 含有の PBS に対して、6 時間ごとに交換しながら一夜透析する。

親和クロマトグラフィー：親和カラムへの吸着と洗浄は 4~5°C, DNP-グリシンによる溶出は室温で行う。

10 ml のプラスチック注射器の外套をカラムに利用する。ベッドボリューム 8~9 ml の DNP-セファロース・カラムを用意し、1 mM EDTA 含有 PBS で十分洗浄した後、部分精製試料を 1 ml/3 分の速度で添加する。次いで 1 mM EDTA 含有 PBS を 2 ml/3 分の速度で添加し、溶出液の 1 ml が Lowry による発色の 750 nm における吸光度が 0.002 以下になるまで洗浄する。洗浄に必要な時間と洗浄液の量は試料量に比例するが、ウサギ 1 羽から採取された全血しょう (50~70 ml) を用いた場合には、7~10 日の洗浄が必要であった。

抗体産生の時間経過をチェックする場合、あるいは、分析-2D-AEP のみを計画する場合には、50~100 μ g の試料量で十分である。このような場合には、耳静脈より 1~2 ml の血液を採取して得た血清を利用する。2 ml の注射器を利用し、1 ml の親和カラムを作成し、試料は硫酸分画操作を省略して、直接カラムに注入する。洗浄は PBS の溶出速度を 1 ml/5 分とし、24~30 時間 (約 300 ml) 行った。

洗浄が終了したカラムは室温において、1 N NaOH で pH を 7.5 に補正した飽和 DNP-グリシン溶液 (約 40 mM) を用いて溶出する。溶出速度と溶出量は上記の 10 ml-カラムの場合に 1 ml/3 分、1 分画管当り 50 滴、2 ml-カラムの場合に 1 ml/10 分、1 分画管当り 20 滴とした。

各分画から 3 μ l をニトロセルロース膜に塗布し、1% Ponceau Red 3R 溶液 (エタノール/酢酸/水: 20/10/70 混液) に 2 分浸した後、7% 酢酸で脱色し、蛋白分画を確認する。大部分の抗 DNP-抗体は DNP-グリシンの初期溶出液中に溶出される。蛋白含有分画 (4~8 分画管) を集め、PBS に対して 6 時間ごとに交換しながら、十分に透析する。抗 DNP-抗体の濃度が 1 mg/ml 以下の場合には透析試料はほとんど無色であるが、5 mg/ml 以上の場合にはわずかに黄色を呈す。蛋白濃度が

260 μ g/ml 以下の試料は減圧遠心濃縮器を用いて 500 μ g/ml 以上に濃縮しておく。精製試料は 0.02% の濃度に NaN₃ を加え、遮光して、凍結保存する。

2) ウサギ抗 Dansyl-抗体の調製⁹⁾

感作および抗体の精製操作は、前項の抗 DNP-抗体の調製と同様に、Dansyl-CSA/CFA による感作と Dansyl-セファロース/Dansyl-グリシンによる親和クロマトグラフィーによった。精製抗 Dansyl-抗体も、そのほとんどすべてが IgG-クラスの免疫グロブリンからなる抗体標品であった。

II. 2 次元親和電気泳動法⁹⁾

II.1 1 次元電気泳動

1 次元目の IEF は長さ 85 mm, 内径 1.25 mm のガラス毛細管に PAG (T=5%, C=3%, キャリア・アンフォライト: pH 範囲 4~9, 1.25%; 5~8, 1.25%) を調整し、恒温ディスク泳動装置 (Fig. 1) を利用して低温にて泳動する。

1) 器具・器材および試薬

恒温ディスク泳動装置：常光社製，Fig. 1 参照

ガラス毛細管：長さ 85 mm, 内径 1.25 mm, Drummond Sci. Co. (Broomall, USA) の 100 μ l 用のマイクロピペットをガラス・カッターで切って使用。

1 次元ゲル調製用プラスチック・シリンダー：高さ

Fig. 1. 恒温ディスク泳動装置

A: 実物写真, B: 模式図. C: ガラス・コンデンサー, E_i と E_u: 下部および上部電極, K: (泳動用) ガラス毛細管, M: マグネット回転子, R: 接続用ゴム栓, V_i と V_u: 下部および上部電極槽。

(4) 生物物理化学

80 mm, 内径 11 mm
マイクロシリンジ 25 μ l 用
定電圧発生装置 (容量: 3,000 V)
小試験管 (約 5×70 mm) と小試験管立注射器: 1 ml
用
アクリルアミド
メチレン・ビスアクリルアミド (BIS)
過硫酸アンモニウム (APS)
テトラメチル・エチレンジアミン (TEMED)
ファルマライト: pH 領域 4~6.5, 6.5~9, 5~8
グリセリン
L-リジン
L-グルタミン酸
1N NaOH
しょ糖
毛細管-IEF 用ゲル調製試薬: Table 1 参照
毛細管-IEF 用電極液: Table 2 参照
Phosphate Buffered Saline (PBS): Table 3 参照

Table 1. 毛細管-IEF 用ゲル調製試薬

貯蔵試薬		使用量
アクリルアミド試薬		0.6 ml
アクリルアミド	48.5 g	
BIS	1.5 g	
水を加えて 100 ml		
キャリア・アンフォライト		
ファルマライト pH 領域	4-6.5	0.094 ml
	6.5-9	0.094 ml
	5-8	0.188 ml
グリセリン水溶液 40% (w/v)		1.5 ml
L-リジン水溶液		0.8 ml
L-リジン	1.58 g	
水を加えて 100 ml		
水		0.98 ml
尿素		2.16 g
上記貯蔵試薬の混合液 (試薬混液-A)		
APS 溶液		0.143 ml
過硫酸アンモニウム	0.21 g	
水を加えて 10 ml		
TEMED		6 μ l

Table 2. 毛細管 IEF 用電極液

上部電極液 (陽極液)	
0.04 M グルタミン酸水溶液	
L-グルタミン酸	5.89 g
水を加えて	1000 ml
下部電極液 (陰極液)	
1N NaOH	

用いる水はすべて超純水が望ましい。

2) 1次元ゲルの調製

1次元ゲルは Table 1 にしたがって調製する。試薬混液 A (5.867 ml) と APS-溶液 (10 ml) とを別々に調製し、水流ポンプで 15~20 分減圧脱気する。試薬混液 A に APS-溶液 0.143 ml と TEMED 6 μ l とを加え、静かに混和した後、1次元ゲル調製用プラスチック・シリンドーの 2/3 の高さまで注ぎ、10~25 本の 1次元泳動用ガラス毛細管の管内に気泡が残らないように注意して投入し、残りの混液をガラス毛細管のゲル液のメネスカスがちょうど 75 mm の高さになるまで追加する。このとき、シリンドーのメネスカスは毛細管のそれより約 5 mm 低い位置にある。ガラス毛細管のゲル表面には水は重層しない。室温 10~15 分の静置でゲル化は終了する。ガラス毛細管の新しいゲル界面は最初のメネスカスの 0.5~0.7 mm 下方に形成される。調製された 1次元ゲルは一夜静置した後使用する。サラン・ラップ等によくシールして低温に保存すれば、数週間は問題なく使用できる。

3) 泳動装置の組立て

電極液の調製: Table 2 にしたがって調製する。

試料液の調製: 試料液は 5~10 μ l 中に 1~2 μ g の抗体を含む液として調製する。たとえば、貯蔵抗体液の蛋白濃度が 0.75 mg/ml の場合には、その 27 μ l に PBS 55 μ l としょ糖 30 mg を加えて混和溶解 (全量 0.1 ml) させたものを試料とし、その 5~10 μ l を使用する。貯蔵抗体液の蛋白濃度が異なる場合には、貯蔵抗体液と PBS の量比をかえて調製する。蛋白濃度が低く、減圧遠心濃縮した貯蔵抗体液 (I.4 1) 項を参照) は濃縮によって、イオン強度が高くなっているため、PBS の代りに水を使って試料液を調製する。試料液のイオン強度が PBS の 2 倍以上高かったり、または、使用量が 15 μ l を越える場合には、再現性のよい泳動像は得られにくい。

ガラス毛細管の装着: Fig. 1 に示したように、まず、

Table 3. 一般緩衝液

PBS (phosphate buffered saline)	
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	4.317 g
KH ₂ PO ₄	1.09 g
NaCl	9.0 g
水を加えて 1 l	
TBS (tris buffered saline)	
2M Tris base	10 ml
1N HCl	16.2 ml
NaCl	8.7 g
水を加えて 1 l	

約 330 ml の下部電極液を下部電極槽 (V_l) に注ぎ、ガラス・コンデンサー (C) を利用して、還流冷却し、電極液の温度を 4°C に保つ。ゲル化の完了したガラス毛细管を注意して 1 本ずつ取り外し、外部に付着しているゲル層をティッシュ・ペーパーでよく拭き取り、小試験管に立て、1 ml の注射器を用いて、気泡が残らないように注意して毛细管のゲルの上端部に上部電極液を重ねる。次いで、25 μl のマイクロシリンジを用いて 5~10 μl の試料液を界面が乱されないように注意してゲルの上に重ねる。ガラス毛细管の上端に 1 mm の細孔のある接続用ゴム栓 (R) を取り付け、上部電極槽 (V_u) に装着し、下部電極槽に重ねる。ガラス・コンデンサーを装置の中央にセットしなおし、使用しない泳動管装着孔は盲管ゴム栓で止める。上・下電極槽間に残っている空気は下部電極液を追加して泳動ガラス毛细管が下部電極液に完全にかかるようにする。下部電極液が上部電極槽に漏れないように注意して温度計 (T) をセットし (この時点で上・下電極槽が遮断される)、約 30 ml の上部電極液を試料界面が乱されないように注意して上部電極槽に注ぐ。

4) 通電

下部電極液の温度が 4°C に達したら、通電を開始する。電源は定電圧発生装置を用い、250 V 15 分、500 V 15 分、1,000 V 15 分、最後に 2,000 V 2 時間通電する。

II.2 2 次元電気泳動

2 次元目の親和電気泳動法は恒温式セミマイクロ平板ゲル泳動装置 (Fig. 2) を利用し、Reisfeld ら¹³⁾の緩衝液系を改変した不連続緩衝液系を用いて行った。

1) 器具・器材および試薬

(前出の試薬は省略する)

Fig. 2. 恒温式セミマイクロ平板ゲル泳動装置

A: 実物写真, B: 側面模式図, C: 上面模式図. C: ガラス・コンデンサー, D: 平板泳動セル密着用スポンジ溝, M: マグネット回転子, V_l と V_u : 下部および上部電極槽。

恒温式セミマイクロ平板ゲル泳動装置: 常光社製 (Fig. 2 参照)

平板ゲル泳動用セル: Fig. 3 参照

1 次元ゲル密着用へら: 幅 80 mm, 厚さ 0.9 mm の水平・平滑な面をもつプラスチック板

ゲル-expeller: Fig. 4 参照

ステンレス針: 長さ 15 cm

注射器: 1 ml 用, 10 ml 用

勾形注射針

蛍光灯

定電圧発生装置 (容量 1,000 V)

酢酸

1 N KOH

メチレン・ブルー

リボフラビン

親和リガンド: I, 2 項を参照

アルミ фольド

分離ゲル調製用試薬: Table 4 参照

濃縮ゲルおよび濃縮用溶液調製用試薬: Table 5 参照

平板ゲル泳動用電極槽緩衝液: Table 6 参照

水はすべて超純水を使用する。

2) 2 次元用平板ゲルの作成

高分子親和リガンド含有ゲル (親和ゲル) および親和リガンドを含まない対照ゲルは Table 4 と 5 に従って調製した。一般には、1 枚の対照ゲルと親和リガンドの濃度の異なる 3 枚の親和ゲルを調製する。使用した平板ゲル泳動装置は 2 枚の平板ゲルを装着できるので、2 台の装置を用意する。以下、その一般的な場合の操作法について説明する。

Fig. 3. 平板泳動セルの上部電極槽への装着

D: 平板泳動セル密着用スポンジ溝, F: 平板泳動ゲル装着用プラスチック製クリップ, P_1 と P_2 : 平板泳動用ガラス板, V_u : 上部電極槽。

Fig. 4. ゲル-expeller

F_1 と F_2 : プラスチック製クリップ (大, 小), K: (泳動の終了した) ガラス毛细管, S: 注射器 (1 ml 用), T_1 と T_2 : タイゴンチューブ。

(6) 生物物理化学

Table 4. 平板ゲル泳動用分離ゲル調製試薬

貯蔵試薬		使用量	
		対照ゲル	親和ゲル
アクリルアミド試薬		1.0 ml	1.0 ml
アクリルアミド	40 g		
BIS	1.067 g		
水を加えて	100 ml		
分離ゲル用緩衝液		2.0 ml	2.0 ml
1 N KOH	48 ml		
氷酢酸	17.2 ml		
TEMED	4.0 ml		
水を加えて	100 ml		
親和リガンド溶液*		—	2.73 ml
水		2.73 ml	—
しょ糖液 40% (w/v)		2.0 ml	2.0 ml
上記貯蔵試薬の混合液 (試薬混液-B)			
APS 溶液		0.27 ml	0.27 ml
過硫酸アンモニウム	0.21 g		
水を加えて	100 ml		

* 親和ゲルに加える親和リガンドの濃度は抗体の親和性の高さに応じて、親和リガンドと水の混合比を変えることによって調整する。本操作法で用いた DNP-PA および Dansyl-PA の場合には、0.1 ~1.0 mM の濃度とした。

Table 5. 平板ゲル泳動用濃縮ゲルおよび濃縮溶液の調製

貯蔵試薬		使用量	
		濃縮ゲル	濃縮溶液
アクリルアミド試薬		1.5 ml	—
アクリルアミド	10 g		
BIS	2.5 g		
水を加えて	100 ml		
濃縮ゲル用緩衝液		1.5 ml	—
1 N KOH	48 ml		
氷酢酸	2.87 ml		
TEMED	0.46 ml		
水を加えて	100 ml		
濃縮溶液用緩衝液		—	3.0 ml
1 N KOH	48 ml		
氷酢酸	2.87 ml		
水を加えて	100 ml		
しょ糖液 40% (w/v)		1.5 ml	1.5 ml
水		0.75 ml	3.7 ml
メチレン・ブルー溶液			
0.05% (w/v)	—		3.8 ml
リボフラビン溶液	0.004% (w/v)	0.75 ml	—

分離ゲルの調製：4組の平板ゲル泳動用ガラス・プレートに2台の泳動装置の上部電極槽に装着し、37℃に調整したインクベーター中に置く。Table 4 にしたがって

Table 6. 平板ゲル泳動用電極槽緩衝液

貯蔵緩衝液, pH 4.5	1 容
b-アラニン	31.2 g
氷酢酸	8.0 ml
水を加えて	1 l
水	4 容

分離ゲル調製のための4種のゲル溶液 (試薬混液 B : 7.73 ml) をそれぞれ 50 ml の小ビーカーに調製し、同じインクベーター中に保存する。別に、新しく調製した APS-溶液を 37℃ の水浴中で加温し、その 0.27 ml をインクベーター中のゲル溶液の一つに加え、よく混和した後、泳動装置をインクベーター中に立てたまま、装着された泳動用プレートの一つに気泡のできるのを避けて 70mm の高さに注入する。残った気泡はステンレス線で完全に除去し、対照ゲル用のゲル混液には水を、親和ゲル用のゲル混液にはそのゲル混液と同濃度の DNP-PA を含む水溶液を界面が乱されないように注意して重ねる。同じ操作を繰り返し、4種の分離ゲルを調製する。ゲル化は 30~40 分で終了する。

濃縮ゲルの調製：濃縮ゲルは4枚の平板ゲルに共通である。Table 5 にしたがって調製する。分離ゲルの調製の終了した泳動セットをインクベーターから取り出し、親和ゲルの泳動用プレートはそのゲル面をアルミ・フォイルで覆う。重層水、あるいは、重層 DNP-PA 水溶液を除去し、ゲル表面を、一度、濃縮ゲル用混液にて洗浄した後、同じ混液を 10mm の高さに重ね、蛍光灯を照射する。20~30 分でゲル化は終了する。

3) 1次元ゲルのセッティングと通電

泳動装置の組立て：Table 6 に従って 3 l の電極用緩衝液を調製し、その 1 l を2台の装置の下部電極槽 (V₁) のそれぞれに注ぎ、ガラス・コンデンサー (C) に任意の温度の恒温水を還流して緩衝液の温度を希望の温度に保つ。泳動用プレートを装着した上部電極槽をその上にセットする。泳動用プレートの下端に残った気泡は勾形針を取り付けた注射器で除去し、泳動用プレートがほとんど完全につかるまで電極用緩衝液を追加する。

1次元ゲルのセッティング：泳動の終了した1次元ゲルはその陽極端 (上端) をゲル-expeller (Fig. 4) の先端に差し込み、固定してから、加圧しながら、下端を約 10 mm 押し出し、数滴の水で洗浄した後、一定の速度で押し出しながら濃縮ゲルの上に置き、局部的に歪が生じないように注意して、1次元ゲル密着へらを用いて密着固定する。Table 5 に従って濃縮溶液を調製し、セットした1次元ゲルが完全につかるまで (約 2 mm 高さ)

注入し、次いで、濃縮溶液の界面を乱さないように注意して電極用緩衝液をその少量が上部電極槽に溢れ出るまで加える。最後に、約 300 ml の電極用緩衝液を追加する。

通電：定電圧発生装置を使用し、50 V 約 15 分の通電によってメチレン・ブルーのバンドが濃縮ゲルを通過した時点で、電圧を 80 V に高め、メチレン・ブルーのバンドがちょうど分離ゲルの下端に達するまで通過する。泳動の温度によって異なるが、2.5~3 時間を要する。

II.3 抗ハプテン抗体の同定

1) 器具・器材および試薬

恒温ブロッティング装置：常光社製 (Fig. 5 参照)

手術用薄地手袋

パンチ：鉄製、内径 2 mm

スパーテル：ステンレス製、幅 85 mm

現像タンク (バット)：32×23×6 cm

蓋付プラスチック容器：約 10×14×3 cm, 市販タッパー・ウェアを利用

振とう器

1 N HCl

スキムミルク

Tween 20

4-クロロ-1-ナフトール

メタノール

過酸化水素：30%

ヤギ抗ウサギ IgG-抗血清

ペルオキシダーゼウサギ結合抗ヤギ IgG-抗血清

Fig. 5. 恒温ブロッティング装置

A: 実物写真, B: 断面模式図. C: コンデンサー, E₁ と E₂: 黒鉛電極板, G: (泳動の終了した) 平板ゲル, H₁ と H₂: 平板ゲル保持板, N: ニトロセルロース膜, P₁ と P₂: ろ紙, S: ナイロン製スポンジ.

ニトロセルロース膜 (NC-膜: 100×75 mm (Millipore, pore size 0.22 μm))

Whatman 3MM ろ紙: 100×80 mm

ナイロン製スポンジ: 100×85 mm (3M Co., USA)

Tris Buffered Saline (TBS): Table 3 参照

ブロッティング用電極槽緩衝液: Table 7 参照

発色操作法: Table 8 参照

水は無イオン水を用いる。

2) エレクトロ・ブロッティング

恒温ブロッティング装置をもちいて泳動・分離された抗体分画をニトロセルロース膜 (NC-膜) に移着させる。低恒温でのエレクトロ・ブロッティングは通電中の気泡の発生を防ぐと同時に、高電圧の適用を可能とし、通電時間を短縮する。操作中は薄地のゴム手袋を着用する。

4 枚の NC-膜, 8 枚の Whatman 3MM ろ紙, 4 枚のナイロン製スポンジをブロッティング用電極槽緩衝液を満たした 500 ml のビーカーに浸し、水流ポンプで 1 時間減圧・脱気する。

ブロッティング装置は平板ゲルをセットするゲル枠と還流冷却板を組み込んだ電極槽とから成っている。ゲル枠は 2 枚の平板ゲルを保持できる 2 個の窓 (85×102 mm) の付いた 2 枚のプラスチック板 (H₁, H₂) からなっている。その一方のプラスチック板 (H₁) の窓はサラン・ネットで裏打ちされ、他方 (H₂) は 1 cm 間隔に細いプラスチック棒が張り付けてある。H₂ をブロッティング用電極槽緩衝液を満たした現像タンクに沈め、両窓に脱気したろ紙を置く。一方、泳動が終了した泳動プレートは装置から取りはずし、カバー・ガラス板をはずし、平板ゲルに記号を付す。教室では径 2 mm のパンチで 1 次元泳動の陰極側の下辺に 1 個から 4 個の小円孔を開け、平板ゲルの番号と電極の方向を確認している。ステンレス製スパーテルを用い、平板ゲルの縁をガラス・プレートの枠の内側に沿って切開し、現像タンクのブロッティング用電極槽緩衝液で濡らしながら平板ゲルに傷を付けないように注意して、上端部から外していく。外されたゲルはブロッティング用電極槽緩衝液に浮かべ、泳動方向を確認し、局所的な歪が生じないように注意して、すでにセットしてあるろ紙に重ねる。そのうえに、脱気した NC-膜とろ紙を気泡が残らないように少し押えつけるように

Table 7. ブロッティング用電極槽緩衝液

貯蔵試薬	使用量
1 M グリシン	200 ml
1 N HCl	100 ml
水を加えて	4 l

(8) 生物物理化学

Table 8. ウサギ抗ハプテン抗体染色操作法*1

ステップ	試薬	使用量 (NC-膜 1 枚当り)	時間
1 洗浄	TBS	100 ml	1 夜
2 ブロッキング	ブロッキング液*2	20 ml	1 時間
3 洗浄	TBS	50 ml	30 秒
4 第一抗体による固定	第一抗体試薬*3	10 ml	3 時間
5 洗浄	Tween-TBS*4	50 ml	5 分
同じ洗浄を 3 回繰り返す			
6 第二抗体による固定	第二抗体試薬*5	10 ml	2 時間
7 洗浄	Tween-TBS*4	50 ml	5 分
同じ洗浄を 3 回繰り返す			
8 ペルオキシダーゼ反応	基質溶液*6	30 ml	5-15 分
9 洗浄*7	水	100 ml	2-10 分
同じ洗浄を 4 回繰り返す			

*1 操作はすべて室温で振とう器でゆっくり振とうしながら行う。

*2 TBS の 5% (w/v) スキム・ミルク懸濁液。

*3 ヤギ抗ウサギ IgG-抗血清 0.08 ml, ヤギ抗ウサギ IgM 抗血清 0.04 ml を 40 ml の 1% スキム・ミルク含有-TBS に混和。

*4 0.05% Tween 20-含有-TBS。

*5 ペルオキシダーゼ結合ウサギ抗ヤギ-IgG 抗血清 0.02 ml を 1% スキム・ミルク含有-TBS 40 ml に混和。

*6 4-クロロ 1-ナフトール 0.06 g を冷メタノール 20 ml に溶解させ、TBS 100 ml と 30% 過酸化水素 0.06 ml を混和。染色液調製の直前に調製する。

*7 洗浄が不十分な場合には痕跡の残存試薬によって NC-膜全体が発色してくる。最初の 2 回の洗浄は 2 分くらいで素早く洗浄し、以後、10 分間隔で 2 回洗浄する。

して順次重ね、その上にナイロン製スポンジを置き、もう 1 枚プラスチック板 (H_u) を重ね合わせ、電極槽にセットする。

電極槽にブロッキング用緩衝液を注ぎ、緩衝液の温度が 6°C に達するまで還流冷却し、ゲル枠を平板ゲルが陽極側、NC 膜が陰極側に来るようにセットし、5 V 2 時間通電する。

3) 染色

ブロッキングの終了した NC 膜をゲル枠から取り外し、1 枚ずつ蓋付きプラスチック容器に入れ、Table 8 にしたがって、洗浄・ブロッキング・第一抗体と第二抗体の結合・ペルオキシダーゼ発色反応・洗浄と順次処理していく。教室では 1 次元泳動、2 次元泳動、およびエレクトロ・ブロッキングの操作を 1 日で行うので、最初の NC-膜洗浄は 1 夜行っているが、30 分で十分である。発色した NC-膜は風乾後、遮光して保存すれば、数週間は褪色せず安定であるが、早期に写真をとっておく。

Ⅲ. 抗ハプテン抗体の 2D-AEP 像

1) 抗 DNP-抗体⁸⁾

Fig. 6 に抗 DNP-抗体の 2D-AEP 像の一例を示した。親和リガンドを含まない対照ゲル(B)では抗体のほ

とんどは pH 5 から pH 8.5 にわたる領域をやや幅の広い 1 本のバンドとなって泳動している。ごく弱いスポットが陽極側のコーナーに見えるが、これは試料に微量含まれている IgM クラスの免疫グロブリンであって、残りはすべて IgG クラスの免疫グロブリンである。250 μ M の DNP-PAG を含んだ親和ゲル(C)の泳動像は特徴的であって、抗体は数百の IgG-スポットに分離され、高度に不均一であることを示している。2 次元目の泳動で泳動距離の長い IgG は親和性が低く、短い IgG は親和性が高い。これらの多数の IgG スポットは横一列に並んだ、すなわち、pI は異なるが親和性の等しい、5~8 個の IgG スポットからなる数十の集団 (family) に組み分けられる。そのうち、明瞭に組み分けられた集団に a~u の記号を付した。これらの集団は諸種の実験結果から、それぞれ、単クローンに由来する IgG であって、転写後の修飾をうけて、親和性は等しいが、pI の異なる IgG 集団を形成したと考えられる。以上のように、2D-AEP を用いれば、多クローン性の抗体から単クローン性抗体を分離できる。このことは、2D-AEP は抗 DNP-抗体の完全分離を可能にする方法であるといえる。

2) 抗 Dansyl-抗体とその交差反応⁹⁾

Fig. 6. ウサギ抗 DNP-抗体の2次元親和泳動像
A: IEF 像, B: 対象ゲルの2次元泳動像, C: 親和リ
ガンド (DNP-PA) 0.25 mM を含有する親和ゲルの2次
元親和電気泳動像

Table 9. 抗 Dansyl-抗体の交差反応と Dansyl-ハプテンおよび DNP-
ハプテンに対する見掛けの解離定数

抗 Dansyl-抗体 IgG 集団	見掛けの解離定数 (K_d^{app})		親和比 B/A
	A: Dansyl-ハプテン	B: DNP-ハプテン	
	($\times 10^{-4}M$)	($\times 10^{-4}M$)	
a	4.77	2.96	0.62
b	0.846	3.64	4.30
c	0.276	14.7	53.4
d	0.353	1.61	4.55

Fig. 7 に抗 DNP-抗体と同様にして得られた抗 Dansyl-抗体の 2D-AEP 像を示した. 抗 DNP-抗体と同様に無数の IgG スポットに分離され, それらは, 親和性は等しいが, pI の異なる数個の IgG スポットからなる集団に組み分けられる.

Fig. 8 に Fig. 7 に使用した抗体と同じ抗 Dansyl-抗体を Dansyl-PA に対してではなく, DNP-PA に対して 2D-AEP を行った場合の泳動像を示した. 大部分の抗 Dansyl-抗体は DNP に対してほとんど親和性を示さないが, 幾つかの抗 Dansyl-抗体は DNP に対して

Fig. 7. ウサギ抗 Dansyl-抗体の2次元親和電気泳動像
親和リガンド 0.1 mM を含有する親和ゲルの2次元親和電気泳動像

Fig. 8. ウサギ抗 Dansyl-抗体の DNP-ハプテンに対する交差反応

試料は Fig. 7 と同じ抗 Dansyl-抗体を用い, DNP-PA の 1.0 mM の DNP-PA を含有する親和ゲルを用いた場合の2次元親和電気泳動像

も親和性を示す. たとえば, 集団 a は DNP に対して強い親和性を示す. 明瞭に同定できる集団 a ~ d について親和電気泳動法の理論に従って, これらの泳動像から Dansyl-基および DNP-基に対する見掛けの解離定数 K_d^{app} ($1/K_d^{app}$ が親和定数を与える) を求めれば, Table 9 に示したように, a は Dansyl-基に対するよりも DNP-基に対して 1.6 倍親和性が高く, 一方, b, c, d は Dansyl-基に対してそれぞれ 4.3, 53.4, 4.55 倍親和性が高いと計算される. いずれにしても, これら抗 Dansyl-IgG 集団は両ハプテンに対して, それぞれ異な

(10) 生物物理化学

る親和性をもっているが、その際、一つの集団に属する個々の IgG スポットは同じ親和性をもった交差反応性を示している。この事実は、それぞれの IgG 集団はそれぞれ単クローンに由来する免疫グロブリンであると推論する根拠の一つである。

この研究の一部は文部省特定研究「不均一抗体から均一抗体を分離するための 2 次元親和電気泳動装置の製作」(課題番号 01870025) により助成を受けた。

文 献

- 1) Wood, C. and Kabat, E. A. : Arch. Biochem. Biophys., **212** : 277, 1981.
- 2) Congy, N. and Mihaesco, C. : Immunology, **35** : 307, 1978.
- 3) Anderson, N. L. et al. : Electrophoresis, **3** : 135, 1982.
- 4) Manabe, T. et al. : Electrophoresis, **6** : 462, 1986.
- 5) Newman, B. A. et al. : Mol. Immunol., **23** : 413, 1986.
- 6) Takeo, K. et al. : Electrophoresis '82, Stathakos, D. (ed.), de Gruyter, Berlin, 1983, pp. 277-283.
- 7) Takeo, K. : Adv. Electrophoresis, **1** : 229, 1987.
- 8) Takeo, K. et al. : Electrophoresis, **10** : 813, 1989.
- 9) Takeo, K. et al. : Electrophoresis, **10** : 818, 1989.
- 10) 竹尾和典 : 新版・電気泳動実験法, 電気泳動学会(編), 文光堂, 東京, 1989, pp. 448-465.
- 11) Porter, R. R. : Method Med. Res., **3** : 256, 1950.
- 12) Parker, C. W. et al. : Biochemistry, **6** : 3408, 1967.
- 13) Reisfeld, R. A. et al. : Nature, **195** : 281, 1962.