〔原 著〕

セルロースアセテート膜等電点電気泳動によって 分離されたイソフェリチンの免疫染色法

山口 穠子・浅川 英男

SUMMARY

Immunostaining method for the sensitive detection of isoferritins separated by isoelectric focusing on cellulose acetate membrane is described in this paper. Methanol was used in order to fix proteins to the membrane. Membrane was shaken in methanol immediately after isoelectric focusing and then incubated in phosphate buffered saline containing a sufficiency of antibody and 2% skim milk. Blocking, a step for filling in the blank of membrane was not necessary. Fine isoferritin profile with clear background was obtained using this procedure. The sensitivity of immunostaining was slightly higher than that of gold staining in which proteins were fixed with sulfosalicylic acid and/or trichloroacetic acid. When 250 ng of liver ferritin was applied on the membrane, minor acidic isoferritin bands also were observed distinctly.

Key words: isoelectric focusing, cellulose acetate membrane, isoferritin, immunostaining.

はじめに

等電点電気泳動の支持体として、ポリアクリルアミドゲルが最も一般的に使われている。セルロースアセテート膜等電点電気泳動（セア膜 IEF）は支持体として、セア膜を用いて等電点電気泳動を行う方法で、ポリアクリルアミドゲルや寒天ゲルを用いた方法と比較して、簡単で迅速な方法である^{1,2)}。また、支持体に膜を用いるので、直接免疫反応や、酵素反応を利用した特異性の高い染色が可能であるという利点をもつ。染色に先立ち、タンパク質を膜に固定するために、通常スルホサリチル酸や、トリクロロ酢酸（TCA）が用いられている。しかし、免疫染色や酵素染色を行う際に、これらの固定液を用いるのは疑問であり、検討する必要がある。

フェリチンはHとLサブユニットが 24 個集まって構

成されるため、両サブユニットの比率の違いにより、等電点の異なる分子が可能性として 25 個存在する。等電点電気泳動によって分離されるイソフェリチンのパターンは、由来臓器によって異なり、また病態によって変化する³⁾ので、その分析は重要である。

今回、フェリチンを用いて、セア膜 IEF 後の免疫染色法について検討を行い、同じくタンパク質の高感度染色法として知られる金染色と比較した。

実験材料と方法

1. 実験材料

アンフォラインは Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden), Separax EF は富士写真フイルム(株)より購入した。フェリチンはヒト肝組織、肝細胞癌組織、HeLa 細胞、ヒト急性白血病細胞 K 562 から、山

Immunostaining method of isoferritins separated by isoelectric focusing on cellulose acetate membrane. Keiko Yamaguchi, Hideo Asakawa; 東京理科大学薬学部臨床病理学教室

Correspondence address: Keiko Yamaguchi, Department of Patho-physiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Science University of Tokyo, 12 Ichigaya Funakawara-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan.

(受付 1991年5月8日, 受理 1991年6月3日)

本稿は故 児玉桂三先生生誕百年記念号に向けて執筆したものである。

口らの方法⁴⁾により精製した。抗肝フェリチンウサギ IgG は当教室で調製したものを、POD 標識抗ウサギ IgG ヤギ血清は Cappel Products (USA) より購入した。スキムミルクは DIFCO Lab. (Detroit, USA) の製品を使用した。

2. セルローズアセテート膜等電点電気泳動法

セア膜は Separax EF を、泳動装置は 2117 Multiphor (Pharmacia) を用いて行った。4°C にセットした還流冷却板上に、ガラス板 (厚さ 1mm), 10% ショ糖含有 5% アンフォライン pH 4~7 (pH 4~6 と pH 5~7 を等量混合) または、10% ショ糖含有 5% アンフォライン pH 3.5~9.5 (pH 3.5~9.5 と pH 5~7 を等量混合) を浸潤させたセア膜、電極ストリップの順に乗せ、500 V の定電圧で 30 分間予備通電した。電極液は、陰極に 1% エチレンジアミン溶液を、陽極に 0.85% リン酸溶液を用いた。その後、陰極ストリップから 1cm の位置にサンプルを 20 μ l 含ませたアプリケーションピース (Pharmacia) をのせ、300 V, 10 分間、500 V, 30 分間、1,500 V, 60 分間通電した。

3. 金染色

膜を 20% スルホサリチル酸に約 10 分間浸してから、精製水で 5 分間 3 回洗浄したのち、山口らの方法⁵⁾により作成した金コロイド液中で振盪しながら染色した。

4. 免疫染色

泳動終了後、100% メタノールで約 30 分間タンパク質固定を行い、PBS で 3 回洗浄した。第 1 抗体として抗ヒト肝フェリチンウサギ IgG を 2% スキムミルク含有 PBS で 200 倍に希釈したものを膜にのせ、37°C で 1 時間インキュベートした。その後 PBS で 10 分間 4 回洗浄し、第 2 抗体として同じ液で 400 倍に希釈した POD 標識抗ウサギ IgG ヤギ血清を用いて同様にインキュベートした。PBS で 10 分間 4 回洗浄した後、2.5% 3,3'-diaminobenzidine, 0.02% 過酸化水素含有 0.1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) と反応させてバンドを検出した。

実験結果

金染色および免疫染色に用いるタンパク質の固定液について検討した結果を Fig. 1 に示す。検体として、肝フェリチン (塗布量 1 μ g), 両性担体は 5% アンフォライン pH 4~7 を使用した。Lane 1 と 3 は 100% メタノール, lane 2 と 4 は 20% スルホサリチル酸溶液で固定した。Lane 1, 2 は金染色, lane 3, 4 は免疫染色したときのイソフェリチンパターンを示す。タンパク

Fig. 1. Immuno and gold stainings of isoferitins after fixing with methanol and sulfosalicylic acid.

One μ g of liver ferritin was applied on Separax EF membrane equilibrated with Ampholine, pH 4-7. Lane 1: SSA, immuno, lane 2: MeOH, immuno, lane 3: SSA, gold, lane 4: MeOH, gold.

質を 20% スルホサリチル酸で固定した場合、金染色では鮮明なバンドが 10 本と、それらより酸性側に薄い 2 本のバンドが認められた (lane 2)。しかし、免疫染色ではその薄いバンドが検出できず、また塩基性のイソフェリチンのバンドも不鮮明であった (lane 4)。10% TCA を固定液として用いたときも同じ結果が得られた。スルホサリチル酸や TCA で抗原性が変化したため、免疫染色の感度が低下したと考えられる。組織や遊離細胞の酵素染色や免疫染色では、それらの固定にメタノールや 5% グルタルアルデヒド含有リン酸緩衝液 (pH 7.2) 等が用いられている。そこで、これらの溶液を固定液として用い、セア膜の免疫染色を試みたところ、100% メタノールで最も良い結果が得られた。Fig. 1, lane 3 のようにスルホサリチル酸で固定したときに検出できなかったイソフェリチンのマイナーバンドも認められ、しかもより濃い染色像が得られた。しかし、メタノールは金染色の際の固定液として不適当であった (lane 1)。

Fig. 2 に種々濃度の肝フェリチンを 20% スルホサリチル酸とメタノールで固定したときの免疫染色像を示す。スルホサリチル酸で固定した場合、塗布量 1 μ g 以下では色がうすくなり、バンドの数も徐々に減少した。メタノールを用いることにより、検出感度は 10 倍以上に上昇したが、塗布量が多いとバンドの分離は悪くなった。

Fig. 3 は正常肝および肝細胞癌組織、HeLa, K 562 細胞から抽出精製したフェリチン (各 1 μ g) をスルホサリチル酸とメタノールで固定した後、それぞれ金染色と免疫染色した結果である。免疫染色の検出感度は金染色と、ほぼ同じかそれ以上であった (Fig. 1 と Fig. 3)。免疫染色の結果、ヒト肝組織のイソフェリチンは pI

Fig. 2. Effect of fixing reagent on immunodetection of iso ferritin.

Liver ferritin applied in lane 1 to 4 were 250 ng, 500 ng, 1 μ g and 2 μ g.

Fig. 3. Isoelectric focusing patterns of various ferritins.

Ferritins were purified from hepatoma (lane 1), normal liver (lane 2), HeLa (lane 3) and K 562 (lane 4). Isoelectric focusing was carried out on Separax EF membrane equilibrated with Ampholine, pH 3.5-9.5.

5.4~6.4, 肝細胞癌, HeLa, K 562 のそれは pI 4.8~5.9, 4.8~5.1 および 5.0~5.7 に認められた。

考 察

電気泳動後のタンパク質の高感度染色剤として、種々の金属コロイドが用いられている^{6,7)}。ポリアクリルアミドゲルの場合、銀コロイドが使用されているが、IEF後のゲルはバックまで黒く染色され、適用が困難であった。抗原抗体反応を利用した免疫染色は銀染色に匹敵する感度の高い方法として知られている。しかし、ポリアクリルアミドゲルや寒天ゲル等電点電気泳動では、ブロッキングする必要がある。一方、セア膜 IEF では直接タンパク質を免疫染色することも、また金コロイドで染めることも可能である。

膜にタンパク質を固定するために、通常用いられてい

る TCA やスルホサリチル酸を用いたとき、金染色では鮮やかな赤い像が得られたが、免疫染色の感度は低くその 1/10 以下であった。タンパク質の抗原性が一部失われたためと考える。そこで、組織切片や細胞の固定に用いられているメタノールやグルタルアルデヒドの使用を検討した。100% メタノールで固定することにより、金染色より少し高い検出感度を得られた。肝フェリチンの場合、250 ng で酸性イソフェリチンのマイナーバンドの検出も可能であった。アビジン・ビオチン系⁸⁾やニッケルを加えた基質溶液を用いることによって、さらに感度を上げることが可能であり、また拡散の少ない diaminobenzidine 以外の発色剤を用いることによってバンドの分離もよくなるものと思う。

セア膜はブロッキング膜と異なり、ほとんどタンパク質を吸着しないので、免疫染色の際にブロッキングを行う必要がない。PBS のみで希釈した抗体を用いたときに認められた、わずかなバックの染色も 2% スキムミルク含有 PBS で希釈することにより防ぐことができた。

固定液を選択することにより、酵素活性を利用した染色も可能であり、セア膜 IEF で直接アイソザイムの分析も期待できる。

ま と め

フェリチンを用いて、セア膜 IEF 後免疫染色するための固定液の検討を行った結果、100% メタノールで最良の結果が得られた。従来のスルホサリチル酸や TCA を用いた場合の 1/10 以下の量の検体ではほぼ同じ染色像が得られた。その検出感度は、金染色と同等あるいはそれ以上で、多くのイソフェリチンから構成される肝フェリチンの場合約 250 ng であった。高感度でしかもブロッキングやブロッキング操作も必要がないので、ゲルを用いた IEF より迅速かつ取扱いが簡単な、利便性の高い方法である。

文 献

- 1) 白井美津子: 電気泳動のすべて, 第1版, 医歯薬出版, 東京, 1981, p. 90.
- 2) 芝紀代子, 他: 生物物理化学, 33: 432, 1988.
- 3) Whittaker, D. et al.: Scand. J. Haematol., 33: 432, 1984.
- 4) 山口裕子, 他: 生物物理化学, 33: 181, 1989.
- 5) Yamaguchi, K. and Asakawa, H.: Anal. Biochem., 172: 104, 1988.
- 6) Moeremans, M. et al.: Anal. Biochem., 145: 315, 1985.
- 7) Moeremans, M. et al.: Anal. Biochem., 153: 18, 1985.
- 8) 鎌田雅史, 他: 生物物理化学, 33: 7, 1989.