〔実験講座シリーズ Part 2〕

固定化 pH 勾配ゲルストリップを用いた二次元電気泳動

戸 田 年 総

はじめに

現在広く利用されている O'Farrell の二次元電気泳動は、一次元目に尿素変成条件下で円柱ゲル等電点電気泳動を、二次元目に SDS 変成条件下で平板ゲル電気泳動を行うもので、血清や組織、細胞抽出液中のきわめて多種類の蛋白質を個々のポリペプチド成分に分離し、個々のスポットとして分離することができる優れた方法である。したがって、細胞の増殖や分化、老化、癌化など様々な研究分野において、DNA レベルで得られた情報と蛋白質レベルで得られた情報を対応させながら、個々の蛋白質の生理的意義や病理的動態を解析する時などに威力を発揮する。O'Farrell の原法は、一次元目の円柱ゲルの取り扱いに、かなりの熟練を要するなど、操作法上にやや難点があったが、最近では、膨潤させるだけで、いつでも安定な pH 勾配が得られ、ピンセットで摘んで容易に取り扱える固定化 pH 勾配ゲルストリップ (商品名: Immobiline DryStrip) が、保存性の良い乾燥状態でファルマシアバイオテックから市販されており、これを利用することにより、熟練者でなくとも失敗なく二次元電気泳動を実施することができる。二次元目の SDS-PAGE に対しても、ファルマシアバイオテックから既製のゲルプレートが市販されているが、こちらのほうは、平板ゲルを自作し垂直式で電気泳動を行うほうが、分離性能の点、およびウェスタンブロットなどでスポットの同定を行う時の操作性の点で優れている。本実験講座では、筆者が二次元電気泳動蛋白質データベースを作成する際に標準法として設定した「固定化 pH 勾配ゲル

ストリップを用いた二次元電気泳動」の操作法を紹介する。

装 置

一次元目の等電点電気泳動は、図 1 に示すように、固定化 pH 勾配ゲルストリップを、シリコンオイルの中に閉じ込めて、温度を一定に保ちながら泳動のできる水平式の装置を用いて行う。市販の装置には、ファルマシアの Multiphor II (Pharmacia Code No. 18-1018-06) や、アナテックの COOL PHOR (Anatech Model 3600) などがあるが、自作も可能である。筆者は自作の装置とアナテックの装置を併用している。

二次元目の SDS-PAGE には、普通の垂直式スラブゲル電気泳動装置が利用できる。筆者は、二次元電気泳動用に設計されたひと回り大型のスラブ電気泳動装置 (アナテック製) を使用している。

器 具 類

ゲルストリップ膨潤容器 (内径 1 cm 程度の透明アクリルパイプをゲルストリップよりも少し長めに切断し、両側をシリコンゴム栓で閉じたもの)、ゲルストリップ固定用のサメの歯状コーム (図 2)、電極濾紙 (Pharmacia Code No. 18-1004-40)、試料塗布用濾紙 (Pharmacia Code No. 80-1129-46)、ピンセット、染色用のポリ容器など。

試薬類の調製

ゲルストリップ膨潤液: 蒸留水 10 ml に尿素 10 g, 10% Triton X-100 1 ml, ファルマライト (pH 3~

Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradient gel strip.

Tosifusa Toda; (財)東京都老人総合研究所分子生物学部門

Correspondence address: Tosifusa Toda, Department of Molecular Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2, Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan.

略号一覧: SDS, sodium dodecyl sulfate; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; DTT, dithiothreitol; BPB, bromophenol blue; TEMED, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine; BIS, N,N'-methylenebisacrylamide.

図1. 一次元目の等電点電気泳動装置。膨潤させた固定化pH勾配ゲルストリップをトレイ内に設置、蒸留水を含む電極用濾紙をゲルストリップの両端に載せる。蛋白質試料を含む濾紙片を陰極端に近い部分に載せて、電極ユニットをセットする（白金電極を電極濾紙に接触させる）。トレイ内にシリコンオイルを注入してゲルストリップと電極濾紙を完全に覆い、蓋を被せる（この図では、蓋は省略されている）。

図2. 二次元目のSDS-PAGE用の平板ゲル。平板ゲルの上端にSDS処理後のゲルストリップを載せ、サメの歯状の樹脂板で押さえる。電極液は、陽極側(下)が0.2 M Tris-HCl, pH 7.5, 陰極側(上)が0.1 M Tris-0.1 M Tricine。

10) 0.1 ml, DTT 40 mg, 0.1 % (w / v) Orange G 0.5 ml, 0.1 M 酢酸 0.5 ml を混合。50°C の温湯で加温溶解し、蒸留水を加えて全量を 21 ml にする（ゲルストリップ 1 本当たり 5 ml を使用、用時調製）。

SDS 処理液：50 % (v/v) グリセリン 20 ml に対し、尿素 15 mg, DTT 0.2 g, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 4 ml, 10 % (w/v) SDS 8 ml, 0.1 % (w/v) BPB 1 ml を混合溶解する（用時調製）。

SDS-PAGE 用陽極液：Tris 24 g を蒸留水約 800 ml に溶かし、1 規定の塩酸で pH を 8.8 に調整後、全量を 1,000 ml にする。

SDS-PAGE 用陰極液：Tris 12 g, Tricine 18 g を蒸留水 1,000 ml に溶かす（pH の調整はしない）。

蛋白質再可溶化液：Tris 3 g, グリシン 7 g, SDS 2 g を蒸留水 1,000 ml に溶かす（pH の調整はしない）。

電気泳動転写用緩衝液：Tris 3 g, グリシン 15 g, SDS 1 g を蒸留水 1,000 ml に溶かす（pH の調整はしない）。

銀染色キット：各社のキットを比較検討した結果、和光純薬の旧バージョン（和光 Code No. 299-13841）が、染色の直線性（定量性）の点で最も優れていた（新バージョンは、高濃度での白抜け現象が起きやすいので、定量分析を行う場合は注意を要する）。

このほか、低粘度シリコンオイル（信越化学 Code No. KF-96-L-5 CS）等電点マーカー（第一化学 Code No. 220760）、分子量マーカー（第一化学 Code No. 181122 and 181066）などが必要である。

操 作 法

長さ 18 cm の Immobiline DryStrip (Pharmacia Code No. 17-1233-01, No. 17-1234-01, No. 17-1235-01) を用いた場合を例にとって説明する。長さ 11 cm のものを用いる場合は、装置の大きさや液量を加減する。

<第 1 日目>

ゲルストリップの膨潤

あらかじめゲルストリップ膨潤容器に膨潤液を約 5 ml ずつ入れておく。ゲルストリップの末端をピンセットで摘んで保護シートを取り除き、ゆっくりと膨潤液に浸す。シリコンゴム栓で両端をしっかりと閉じ、ゲル面が上に向くように寝かせて、室温に一晩放置する（ゲル面が重ならないようにするために、1 本ずつ入れる）。

<第 2 日目>

蛋白質試料の調製

血清蛋白質の場合、血清をゲルストリップ膨潤液で 10~20 倍に希釈し、試料液とする。組織蛋白質の場合には、組織 1 g 当たり 1~3 ml のゲルストリップ膨潤液を加えてホモジナイズし、その遠心上清を試料液とする。

等電点電気泳動の実施

ゲルストリップを膨潤容器から取り出し、ゲル面が横を向いた状態で濾紙の上に 1 分間ほど立てて余分の液を除いた後、ゲル面を上に向けて泳動用のトレーに並べる（ゲルストリップには向きがあるので、尖ったほうが陽極側にくるようにする。数本並べて同時に泳動することができる）。

電極用の濾紙を蒸留水に浸し、ひと回り大きめの乾いた濾紙に挟んで余分な水分を取り除いた後、ゲルストリップの両端に重ねて置く（末端部にはゲルがないので、電極濾紙がゲル部分に接触していることを確認する）。

蛋白質試料液 5~10 μ l を試料塗布用濾紙に染み込ませ、陰極近傍のゲル上に置く。

電極用濾紙に接触するように白金電極をセットする。

トレーの中にシリコンオイルを流し込み、ゲルストリップと濾紙全体を完全に大気から遮断する。

蓋を閉じ、500 V で 3 時間、700 V で 1 時間、1,000 V で 1 時間、1,500 V で 1 時間、2,000 V で 1 時間、2,500 V で 1 時間、3,000 V で 12 時間、等電点電気泳動する（筆者は、プログラム自動制御方式の電源を使用している）。

SDS-PAGE 用ゲル板の調製（ゲルサイズ 19×17 cm、厚さ 1 mm のゲル板を 4 枚同時に作る場合）

あらかじめ、ゲル調製用のガラス板を 4 組用意し、スタンドに立てておく。35 % (w/v) アクリルアミド 50 ml、2 % (W/V) BIS 28 ml、1.5 M Tris-塩酸緩衝液 (pH 8.8) 59 ml、50 % (v/v) グリセリン 40 ml を混合し、蒸留水を加えて全量を 235 ml にする。水流ポンプ（アスピレータ）等で吸引減圧して数分間脱気後、10 % (w/v) SDS 2.4 ml、10 % (w/v) 過硫酸アンモニウム 0.25 ml、TEMED 0.15 ml を加え、混和する。ゲルが固まらないうちに、手早くガラス板に流し込み、その上に少量の蒸留水を静かに重層する。サランラップ等で上端を覆い、室温に一晩静置してゲルを重合させる。濃縮ゲルの調製はとくに必要としない。

<第 3 日目>

ゲルストリップの SDS 処理

膨潤に用いたのと同じような円筒容器に、あらかじめ SDS 処理液を入れておく。ゲルストリップをピンセットで摘んで蒸留水の中で軽く揺すり、表面のシリコンオイルを洗い流した後、SDS 処理液を入れた容器に移す。シリコンゴム栓をし、容器を寝かせて穏やかに揺らしながら 40 分間インキュベートする（後日、二次元目の SDS-PAGE を行う時は、30 分インキュベート後、ゲルストリップはサランラップに包み、SDS 処理液と別にして凍結保存する。使用時に、SDS 処理液を解凍し、ゲルストリップを戻して約 10 分間インキュベートする）。

SDS-PAGE の実施

あらかじめ作製しておいた SDS-PAGE 用ゲル板の上端にゲルストリップを置き、図 2 のようにサメの歯状の樹脂板で押さえて両者を密着させる（ゲル板の上端に陰極用の電極液を満たしておくと、ゲル板とゲルストリップの間に気泡が入るのを防ぐことができる）。

ゲル板 1 枚当たり 5~10 mA 程度 of 定電流または、100~200 V 程度 of 定電圧で電気泳動し、BPB が先端にきた時点で止める。

スポットの検出

市販のキット等を用いて銀染色を行う。ウェスタンブロット法などで特異的に蛋白質の検出を行う時は、

銀染色に比べ多少高濃度のサンプルを用いて二次元電気泳動を実施後、和光の Quick CBB などを用いてクマジー染色し、7%の酢酸を用いてバックグラウンドが十分に白くなるまで脱色する。蒸留水で2回（各30分間）洗浄後、蛋白質再可溶化液中で15分間インキュベートし、電気泳動転写装置にセットしてPVDF膜に転写する。こうすることによって主要な蛋白質スポットの位置が膜上にマーキングされ、スポットを同定する際のランドマークとして利用できる。以後の操作（ブロッキング、一次抗体、二次抗体、発色反応）は通常の一次元的な SDS-PAGE 後の操作と基本的に同じであるので、ここでの説明は省く。

<補 足>

等電点マーカースを使用する場合は、あらかじめ蛋白質試料中に混合して等電点電気泳動する。また、分子量マーカースを使用する場合は二次元目の SDS-PAGE の時に、ゲル板の上端全体に添加する。マーカース塗布

用の溝は特に作る必要はない。こうすることによってマーカースは罫線状となって現れ、ゲル板全体にわたってより正確な分子量を決定することが可能となる。

おわりに

既製の固定化 pH 勾配ゲルストリップを用いた二次元電気泳動は、操作が簡便であるばかりでなく、分離の再現性が高く、初めての人でも失敗なく良好なパターンを得ることができる方法である。しかし、製品のロットによって、分離性能に若干のばらつきが生じる可能性も皆無ではないので、2種類あるいはそれ以上の蛋白質試料間でパターンを相互に比較分析する場合は、一次元目の等電点電気泳動を同一ロットの製品を用いて同時に実施し、二次元目の SDS-PAGE も同時に作製した同一ロットの自作ゲルを用いて行うことが望ましい。