濾紙電気泳動を行う際の染色と脱色の血 清蛋白分層値に対する影響

(指導教授 原島 進)

慶応義塾大学医学部衛生学・公衆衛生教室

林 喜 男

Influence of Dyeing and Decoloration Process on Serum

Protein Fraction Value in the Paper-electrophoretic Analysis

Yoshio Hayashi

Department of Preventive Medicine and Public Health

School of Medicine, Keio University

(Prof. Susumu Harashima)

When a measurement of serum protein fractions by the paperelectrophoretic method is made, it is assumed that the amount of dyestuff adsorbed onto serum protein of the paper is proportional to the content of the latter. This assumption, however, is not necessarily correct, since the amount of dye per unit of protein does not keep constant, if the concentration of adsorbed protein increases more than a definite one. This was shown by the present author's experiment. Accordingly, in order to get the true values, extinction readings must be corrected in regard to protein concentration by the calibration curve which was obtained here.

When the dyestuff of the paper was washed out by 0.5% acetic acid aqueous solution containing free chlorine in it, the adsorbed dyestuff of the protein as well as of the paper is simultaneously decolored to such an extent as to interfere with the extinction readings. Thus the percentage of each serum protein fraction will not indicate the true one. In order to prevent this effect by decoloration of the dyestuff, a drop of 5% sodium thiosulfate solution was added to 2 liters of acetic acid solution, the water of which was from city water supply. By this method the author obtained the satisfactory pattern of the serum protein fractions which indicated minimum standard errors.

前の報告¹⁾で著者は、紙片法がピベット法より泳動を行うに際して優れていることを述べたが、その際濾紙の染色性と脱色性については触れなかった。

濾紙に吸着した蛋白質の量に比例して染料が吸着するかどうか、また蛋白質の種類^{2),3)}によつて、染色力が異なるか、と云う問題について種々の論議があり、さらににまた染色してから脱色を行う際の脱色方法^{4),5)}によつても、蛋白に吸着した染料の値は異なつて来る。この様

に血清蛋白を泳動して、その泳動像を得ても、その分層値は個々の人々によってまちまちであり、正しい値が得られていないので、ここで染色性と脱色性という問題を取り上げて検討した。

実験装置及び測定方法

実験装置は前報告¹⁾のものと同じである。

泳動条件は、通電電圧 0.6V/cm, 電流 0.02mA/cm,

泳動時間6時間半、緩衝液はペロナール pH 8.6 $\mu=0.05$ である。

乾燥は 100°C の恒温槽に泳動直後直ちに入れ 20 分間乾燥した。一日室温に放置後アミドシュワルツ10Bで 10°C 、10 分間染色し、直ちに脱色を行なつた。

脱色方法は三つの方法を使用した。第1法として、溶媒に水道水を用いた 0.1% 酢酸水、第2法として、溶媒に水道水を用いたが、その水道水中の遊離塩素を除いて使用する。塩素除去法は、水道水を煮沸するか、5%ハイポ水を百分の1ぐらい入れるか、又はイオン交換樹脂に通すかをすればよい。即ち第2法は遊離塩素を除いた水道水を溶媒とした 0.5% 酢酸水、第3法は、アルコール、酢酸溶液 (9:1) を用いた場合である。

水溶液で脱色する場合は、何回も濾紙を洗滌し、24時間間脱色を行ない、蛋白の吸着してない濾紙の部分が、完全に脱色される迄行なう。

アルコール溶液を使用する場合は、何回も洗滌するが、蛋白の吸着してない濾紙の部分が薄青色になれば脱色をやめた。

血清はウサギの血清を使用し、その採血方法は前報と

同じである。

濾紙はワットマン No.1, 蛋白の塗布方法は紙片法を用いた。

定量法は、直接法即ちパラフィン固定とパラフィンオイル・ α -プロモナフタレンの二方法を用い、比較のため抽出法も行なつた。

デンストメーターの補正曲線は、次の様にして作つた。

濾紙を巾1糎、長さ5糎に切り、それを各々一組の異つた既知濃度の血清蛋白溶液に1分間浸す。紙片を取り出して 100°C 20 分間乾燥させた後、アミドシュワルツの染色液²⁾で 10°C 、10 分間染色し、脱色に第2法によつて脱色して、蛋白濃度が0の溶液に浸した紙片が、純白になる迄脱色した。

かくして吸着蛋白に染色された紙片を3組と、染色しない紙片の組を1組作った。

染色した1組は、デンストメーターの補正用として、パラフィン固定をして、デンストメーターで吸光度を読んだ。他の1組は、グラスマン等の使用したパラフィンオイル法²⁾を用い、デンストメーターでその吸光度を読

んだ。他の染色して1組は、0.01Nの苛性ソーダー水溶液5ccで抽出して、ベックマンB型分光光度計で吸光度を測定した。最後の染色しない紙片の1組は、0.01Nの苛性ソーダー3ccに吸着蛋白質を溶出させ、紫外線吸収から 36cm^{-1} の波数の吸光度を測定した。装置はツアイス分光光度計を使用した。

実験結果並びに考察

I 染色性 濾紙に吸着した蛋白質量に比例して染料が附着するか、否か、を検討した。

まずデンストメーターと光量との関係を見ると、吸光度が1.6まで、光量と吸光度との関係は、光量が増加すると吸光度は多少二次曲線的に減少して来るが、大体直線と考えてもよい。そこで総蛋白濃度既知の蛋白溶液に浸した紙片を、染色、脱色した各組のパラフィン固定、パラフィンオイル法、溶出

第1図 蛋白溶液濃度と紙片の吸光度

第1表 吸着蛋白量と結合染料量

蛋白溶液 濃度 g/dl	直接法の吸光度		濾紙上に吸着した 蛋白量 mg	吸着蛋白に結合 した染料量 mg	結合染料量 染料量
	パラフィン固定	流動パラフィン			
0.	0.	0.	0.0	0.00	
0.553	0.107	—	0.024	0.020	0.83
0.111	0.198	0.133	0.045	0.033	0.73
0.221	0.333	—	—	—	—
0.332	0.403	—	0.147	0.093	0.63
0.442	0.545	—	—	—	—
0.553	0.615	0.582	0.240	0.153	0.64
1.106	0.978	0.962	0.486	0.305	0.63
2.212	1.276	1.30	0.969	0.488	0.50
3.318	1.413	1.375	1.455	0.570	0.39
4.424	1.499	1.395	1.962	0.605	0.31
5.530	1.523	1.400	2.340	0.620	0.26

法の蛋白溶液濃度に対する吸光度は、第1図に示す如くなる。即ち、直接法では、蛋白濃度が濃くなるにつれて、吸光度も飽和する様であるが、パラフィン固定もパラフィンオイル法もあまり優劣はない様に思われる。間接法は、直接法に比較してかなり直線性がよい。しかし両法に於ける測定に於て、ある蛋白濃度以上では、吸光度—蛋白溶液濃度曲線が飽和する様である。この原因は、デンストメーターの特性でないことは、前の実験により明らかなので、吸光度の飽和の原因をさぐるべく次の測定を行なつた。

濾紙上の吸着蛋白質に吸着した染料の量を出すべく、染料の各波長における吸光係数を測定すると、500m μ で $E_{cm}^{mg/cc} : 14.70$, 540m μ で $E_{cm}^{mg/cc} : 26.38$, 620m μ で $E_{cm}^{mg/cc} : 62.30$ となつた。吸収極大は 620m μ にある。著者は、染料の濃度が稀い場合は、波長 620m μ 、濃い場合は波長 540m μ で、染料濃度を測定した。

紙片上吸着した染料の量が染料を溶出し、その濃度を測ることより計算出来るので、次の紙片上に吸着した蛋白量との関係を検討した。

ロシ上に吸着した蛋白量を 0.01N 苛性ソーダーで抽出し、36cm $^{-1}$ の波数で測定した値は、第一表に示される。ここで、蛋白の 36cm $^{-1}$ の波数における吸収係数 $E_{cm}^{g/dl} : 1.43$ とした。

以上の結果より、ロシ上に吸着する蛋白量は、ロシ片を浸す蛋白溶液濃度と比例関係にあるが、濾紙に吸着した蛋白量と、蛋白に吸着した染料とは、比例しないことが、第1表6列に示してある。これを図示すると、第2図の如くなる。すなわち、ロシ上に吸着した単位の蛋白

第2図 濾紙上に吸着した蛋白量と吸着蛋白に結合した染料との関係

長さ 5cm 巾 1cm の濾紙に吸着した蛋白量

量に吸着する染料の量は、一定の大きさのロシ上に吸着した蛋白量が濃くなるにしたがつて、減少することが分つた。

ロシ上に吸着した蛋白濃度が濃くなると、そのロシを染色する際、染料の吸着が、吸着蛋白量と比例せず、だんだん染料がつきににくくなるため、第一図の如く、ある点で吸光度が飽和して来るものと思われる。このことは、血清蛋白を泳動して、直接に定量する際の各分層値が塗布蛋白量によつて変化する原因となるとともに、各分層値が誤つた値を示す結果となる。以上のことから蛋白質の種類によつて染着力²⁾が一ようであるとしても、分層像に吸着蛋白量の濃度差があるため、正しい分層値が得られないのである。このため著者は、第1図の間接法での直線部分を、全濃度範囲に拡張して補正直線となし、直接定量法の吸光度の真の値とした。しかし実際には、吸光度 0.8 以下になるように血清蛋白塗布量を制限すれば、補正をしなくともよいのである。

このために著者は、長さ 45mm 巾 2mm のロシ片をウサギ血清を緩衝液で 2 倍に稀釈した血清に浸してから、塗布する方法で測定を行なつている。

第2表 各種脱色法による蛋白分層白分層値の
平均値と測定誤差（同一試料）

脱色液	直接法		間接法	
	0.5%醋酸水道水 平均値±誤差 $\bar{x} \pm S$	0.5%醋酸ハイポ水 平均値±誤差 $\bar{x} \pm S$	0.5%醋酸ハイポ水 平均値±誤差 $\bar{x} \pm S$	0.5%醋酸ハイポ水 平均値±誤差 $\bar{x} \pm S$
A/G	2.27±0.36	3.10±0.18	3.73±0.49	
Al %	68.88±3.70	75.58±0.86	78.66±2.20	
α_1 -G1 %	3.92±0.76	3.55±0.34	4.42±0.55	
α_2 -G1 %	4.73±0.69	3.97±0.30	3.20±0.56	
β -G1 %	11.25±1.58	9.38±0.67	7.28±0.89	
γ -G1 %	11.32±2.22	7.52±0.76	6.57±0.79	

(註) 直接法はパラフィン固定
間接法は抽出法

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$
$$S = \left(\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Ⅱ 脱色法 同一ウサギの血清を泳動し染色したものを、前述の脱色方法すなわち、0.5%酢酸水道水で脱色する第一法と水道水にハイポを1滴入れた遊離塩素の無い水道水を溶媒とした0.5%酢酸ハイポ水で脱色する第2法とを比較したのが第2表である。定量表はデンストメーターで直接吸光度を測定する直接法と一度0.01N苛性ソーダーに染料を溶出して測る間接法も比較のため同一試料で実験を行なった。測定値は補正した値を示す。補正した値の第二法で脱色した分層値は、直接法と間接法ともとにかくかなり一致した値を示すが、第1法で脱色した分層値は、かなり値が異なり、測定誤差も前者と比較するとかなり大きい。前回の報告で、第1法脱色はかなり累加吸光度すなわち、血清塗布量と分層値との相関が高く、そのA/Gの1例を図示すると第3図の如くであった。これと第2法で脱色した（同一試料の泳動像について）デンストメーターの補正をしないで、累加吸光度と分層値との関係を示したのが下の直線である。すなわち血清の塗布量が多いと、A/G比は低下し、塗布量が少ないとA/G比は上昇することを報告したが、第2法脱色では、第3図より分る如く、ほとんど累加吸光度

第3図 水道水、ハイポ水道水を用いた脱色法の比較（A/Gについての例）

と分層値との相関はなく、累加吸光度が大きくなるとA/Gは下昇する傾向にある、しかしこれもデンストメーターの補正を行なえば、略々血清塗布量によらないことが分つた。

第3法のアルコール・酢酸脱色液で脱色する方法は、第2法と略々同じ結果であつたが、溶媒が高価で回収が不便であるので実用上問題にならない。

第4図 ウサギ血清蛋白分層像

第一法で累加吸光度とA/G比が逆七列するのは、次の如く考へられる。第4図に示される泳動像が脱色液中の遊離の塩素により染料が脱色されて、元来は(a)の像であつたものが、脱色により(b)から(d)の位置にまで遊離塩素により脱色されてしまう。その場合の各分層の値を示すと第3表の如く分層値は変化し、1例をA/Gで示すと、遊離塩素によつて脱色される程度が大きくなるとA/G比が上昇して来る。すなわち累加吸光度と分層とはかなりの相関を示すのである。しかし第2法での脱色では、このことがないために累加吸光度と分層値との相関は低く、累加吸光度が大なるにつれてA/G比がいくぶす低下するのは、濾紙上に吸着した蛋白濃度が高いと、染料の吸着力が減少して来るためで、これを補正すれば、塗布量すなわち累加吸光度と分層値との相関は無い。

第3表 脱色の際遊離塩素によって色素が脱色されたと仮定した場合の蛋白分層値

脱色の程度	A/G	Al %	α_1 -G1 %	α_2 -G1 %	β -G1 %	γ -G1 %
第4図のaの位置	1,179	54.1	6.0	8.3	12.8	18.8
第4図のbの位置	1,450	59.2	5.6	8.0	11.5	15.8
第4図のcの位置	1,840	64.8	4.8	7.1	8.8	14.5
第4図のdの位置	2,819	73.8	3.5	5.8	4.9	12.0

結 論

1 濾紙上に吸着した蛋白濃度が濃くなると、それに吸着する染料の量は、吸着蛋白に比例しなくなる。このことは泳動を行なう際各分画の濃度が異なっているため、染色法で分層値を出すと間違つた値となる。このため染料濃度の吸光度と蛋白量との関係を明らかにして、その補正を行う。あるいは、デンストメーターの読みを最高0.8の吸光度以下に蛋白塗布量を制限しなくてはならない。

2 濾紙を脱色する場合、0.5% 酢酸水溶液中に遊離の塩素が入っていると、その塩素が色素を侵してその結果分層値が真の値から異って来る。故に遊離塩素を無くした水道水を用いれば、蒸溜水を使用した場合と同じ結

果となる。水道水中の遊離の塩素をなくすのに5%ハイポ水を2lの水道水に1滴加える方法がよい。

文 献

- 1) 林 喜男; 生物物理化学 **6** 13 (1958)
- 2) W. Grassmann und K. Hanning: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **290**, 1 (1952)
- 3) C. A. von Frijtag Drabbe and J. G. Reinhold: Anal. Chem. **27**, 1090 (1955)
- 4) K. M. Formusa, R. R. Benerito, et al. Anal. Chem. **29**, 1816 (1957)
- 5) 阿部正和, 猪熊孝治等: 生物物理化学 **3**, 157 (1956)

J. Hrezstein et al.: Fat-loading Studies in Relation to Age.

A. M. A. archive of Internal Medicine **92** (1953)

平均年齢 24.9 才および 62 才の 2 組について fat-loading test を行ない alimentary lipemia に関して年齢による差があるかどうかを研究した。

なおこのテストに使つた人達は代謝上の欠かぬはもつていないし、また atherosclerosis にともなつておこる紅斑もなかつた。

chylomicron を数える方法およびそれを改良した方法は不適當であることがわかつた。

絶食した人々に体重に 1 kg ついて 1 g の脂肪に相当する量の甘いクリームを試験のための食事として与えた。絶食時の血清脂質、食事後 2, 4, 6, 12, 24 時間経過した血清の全脂質について化学的定量を行なう。

青年組(若年組)での絶食時全脂質は、638mg/100ml, 老人組では 809.1mg/100ml であつた。

2 時間後では全脂質増加量は両組共に同じだつた。しかし 6 時間後に青年組の方はもとにもどつてしまつたのに対し、老人組では 4 時間後も 6 時間後も増加を見せていた。食事後 24 時間も老人組では、絶食時よりも血清脂質の量が多かつた。

6 人の健康組に関しての研究では 6 時間しかやならなかつたけれども ほぼ若者組と同じ結果で、4 時間には alimentary lipemia は浄化された。

どの組についても食事後の lipemia の増加減少には特別な型はみられなかつた。しかし最高値は老人組の方がおそくあらわれた。

脂肪摂取に対する反応が老人ではおそくなつていくということが血清脂質の量が 24 時間も多くなつていくということから判る。

prolonged postprandial lipemia が老人が脂質代謝をしなくなつていくことを示すものであるかどうか、又 そうだとしてもそれが atherosclerosis への前兆を示すものであるかどうかは今のところは不明である。

Clayton R. A. and Strong F. M.; "New Solvent System for Separation of Amino Acids by Paper Chromatography, Analyt. Chem. **26**, 1362 (1954)

メチルエチルケトン: プロピオン酸: 水 = 75 : 25 : 30 の混合物を溶媒として用いる。この溶媒は Whatman No. 1 を用いると 20 時間に約 40cm うごく、24 のアミノ酸の R_F 値を決定した。