

## 〔一般演題〕

## 4. 高圧セ・ア膜等電点電気泳動法

## I. 高圧泳動に適した装置の開発と、1次元的分離に至る適な高圧泳動条件の設定

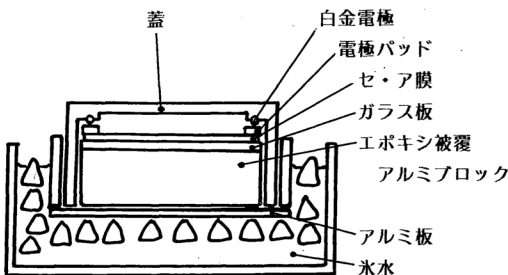
○戸田年総・大橋望彦(都老人研・生化学)  
 芝 紀代子・長 裕子(東京医歯大・医検・生化学)  
 中尾 真(同上・医・第1生化学)

近年、検査室においても等電点電気泳動法(主にアガロースゲルやポリアクリルアミドゲルを支持体とする方法)の利用が増加しており、今後さらに取扱いの容易なセ・ア膜を用いた方法の利用も増加するものと予想される。しかしセ・ア膜等電点電気泳動法は、いまだに①再現性が悪い、②周囲の湿度環境に左右されやすい、③像が歪みやすい、④実施者の熟練度によって結果が異なる等の悪評が拭い去れておらず、ゲル法に比べて評価が低い。これは、装置と操作法の至適化が不十分な為であると考えられる。

一方、加齢に伴う組織蛋白質の変化<sup>D</sup>を解析する目的で開発された2次元セ・ア膜電気泳動法(2DCAE法)<sup>2)</sup>は、第1次元目にセ・ア膜濃縮電気泳動を、第2次元目にセ・ア膜等電点電気泳動を実施する方法であるが、再現性および分離能の点で極めて優れている。そこで我々は、この2次元セ・ア膜電気泳動法の第2次元目で用いられている装置および泳動条件を、検査室における1次元的分離に適するよう更に改良し、低温(1~2℃)条件下、高電圧による泳動方法(高圧セ・ア膜等電点電気泳動法)を確立することができた。以下にその装置の特徴と操作法を述べる。

## 《装置》

構造の概略を下図(断面図)に示す。本装置の最大の特徴(改良点)は、高電圧泳動(1500V)に耐えるようにセ・ア膜の冷却効率をさらに高めたこと(冷却台の材質をアクリルからエポキシ樹脂被覆アルミブロックに変更)と、冷却水循環装置がない所でも利用できるよう、氷水による冷却法に変更したことである。周囲の環境(特に蒸気圧と炭酸ガス)の影響を排除するための配慮(槽内空間を極小とし、気密を良くすること)は従来の2次元セ・ア膜電気泳動用の自作装置においても既になされていたが、本装置では電極を蓋の裏に直接固定(従来はバネを介して固定)することで空間をさらに小さくできた。



## 《操作法》

泳動・染色・乾燥用の試薬類の組成を下に示す。基本的には2次元セ・ア膜電気泳動法で用いているものと同じであるが、両性担体をセパライン(従来はアンホライン)とし、かつ濃度を高くすること(5%を10%に変更)によって、パターンの波打ち現象を抑えることができた。本改良法の最大の特徴は、泳動を高電圧(1500V)で行うことにある(従来法では最高800V)。これによって、①泳動時間の短縮、②再現性の向上、③分離能の向上が実現された。[セ・ア膜]セバラックスEF(110x60mm)、[電極パッド]ワットマンGF/B(58x5mm)、[両性担体液]10%(w/v)セパライン(pH3.5-10)/10%(w/v)蔗糖、[陽極液]1%(v/v)リン酸/30%(w/v)蔗糖、[陰極液]1%(v/v)エチレンジアミン、[固定液]20%(v/v)スルホサリチル酸、[染色液]0.06%(w/v)クマジ-6250/3.2%(w/v)スルホサリチル酸/5%(w/v)トリクロル酢酸/50%(v/v)エタノール、[脱色液]20%(v/v)エタノール/10%(v/v)酢酸、[乾燥液]0.2%(w/v)ポリビニールアルコール(ゴ-セノールGH-17)/7.5%(w/v)グリセロール/5%(v/v)酢酸。

[手順] 1. セ・ア膜を両性担体液に1分間浸し、冷却台にのせる。2. 膜面上にうきあがった余分の液を沓紙で押えて吸取る。3. 電極パッドを電極液に浸し、沓紙上で余分の液を除いてセ・ア膜の両端に置く。4. 蓋を閉じ、予備通電する(500V30分)。5. アプリケータで試料を塗布する。6. 冷却水槽に氷水を入れる。7. 本通電する(300V10分、500V30分、1500V45分)。8. 膜を固定液に10分間浸す。9. 膜を染色液に6分間浸す。10. 膜を脱色液に30分間浸す(液を2~3回交換)。11. 膜を蒸溜水に1分間浸す。12. 膜を乾燥液に15分間浸す。13. 膜をガラス板に載せ、余分の液を沓紙で十分に吸取り、室温で1夜(60℃で2時間以上)乾燥する。

## 《結語》

今回我々が開発した高圧セ・ア膜等電点電気泳動法は、①操作性、②再現性、③分離能に優れ、検査室での使用に適した方法であることが確認された。

1. Fujita, T., Toda, T., Ohashi, M.: *Electrophoresis '83* Walter de Gruyter & Co.: pp. 163-170, 1984.
2. Toda, T., Fujita, T., Ohashi, M.: *Anal. Biochem.*, 119: 167-176, 1982.