

フルラム蛍光標識を用いた低分子ペプチドの SDS ポリアクリルアミド ゲル ディスク 電気泳動について

北村陽子* 松本照代*

On the SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Low Molecular Weight Peptides

with Fluram as Fluorescent Reagent

Yōko Kitamura, Teruyo Matsumoto

〔内容抄録〕フルラム蛍光標識使用の15%、30%（架橋比1:37）SDSポリアクリルアミドゲルを用い、2週令ブロイラー、雌、胸肉、肉漿蛋白質のディスク電気泳動を行なった。試料緩衝液として、ホウ酸緩衝液とトリス緩衝液の影響を検討した。15%ゲルではアミノ酸と分子量1~2万以上のバンドが10本、中間にペプチド区分がみられた。トリス緩衝液ではこのペプチド区分に蛍光がみられ、今後の実験に不適當であった。標準物質を15%、30%ゲルと8M尿素入り（架橋比1:10）SDSポリアクリルアミドゲルで泳動した。3種ともカルノシンからミオグロビンまでは直線関係にあったが、アミノ酸は直線からはずれた。尿素入り15%ゲルではBPBよりカルノシンがおくれるが、15%ゲルではBPBより⊕極に進んだ。易動度の差の大きかったのは尿素入り15%ゲル、30%ゲルであったが、結果があざやかなのは尿素入り15%ゲルであった。30%ゲルはかたすぎきれいな結果が得られなかった。

I 緒 言

蛍光試薬を用いたアミノ酸、ポリペプチドの分析法は比色分析にくらべ10~100倍の感度をもち、貴重な試料を扱うに有効な方法である。又、ディスク電気泳動後の染色法で検出出来ない130~1200の低分子ペプチドの検出も可能である。ペプチドの蛍光分析は古く8-anilino-naphthalen-1-sulfonate¹⁾によるものがあり、ダンシルクロライドの使用はWeber²⁾が最初に用いている。フルラム³⁾ (4-phenylspiro (furan-

2(3H) 1'-phthalan)-3, 3'-dione) は pH 8.6—9.0 で1級アミンと反応し、蛍光物質を形成する。著者はクマシブリリアントブルーなどで染まらない1000以下の低分子ペプチドの検出にフルラムを用い、加藤ら⁴⁾の報告した8M尿素入り高架橋度SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法の分析条件を検討したので報告する。2週令ブロイラー、雌、胸肉、肉漿蛋白質を同法と対照として15%および30% SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法と比較した。

* 食品学第4研究室

注 SDS=sodium dodecyl sulfate
DTT=dithiothreitol
EDTA=ethylen diamine tetraacetate
BPB=bromophenol blue

II 実験材料及び実験方法

試料溶液の調製：前報⁵⁾と同様に処理した2週令ブロイラー、雌、胸肉を30g精秤し、0.05Mリン酸緩衝液(pH 7.6) 325 mlで3分間均質化し、7000 rpmで遠心分離後上澄液を試料とした。

試薬：1) アクリルアミド 和光純薬工業 K. 2) NN'-メチレンビスアクリルアミド(BIS) 半井化学 KK. 3) NNN'N' テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) 4) 過硫酸アンモニウム 5) フルラム (Fluorescamine) 日本ロシュ KK 6) Val-Val-Val-Ala Kata-kai⁶⁾ の報告により合成した。7) ミオグロビン 8) カルノシン 9) インシュリン 10) インシュリン B鎖は SIGMA Chemical Company 11) トリプトファン 12) ヒスチジン 13) セリン 14) グリシンは味の素 KK 14) リゾチーム エイザイ KK のものを使用した。

分離ゲルの作成：1) 15及び30% 架橋比 1:37 SDS ポリアクリルアミド ゲルは表1に示した保存溶液を混合して作成した。即ち、30%ゲルは a: 15 ml, b: 13.5 ml, c: 1.5 ml, d: 0.045 ml を混合する。15%ゲルの場合は b: 6.75 ml を使用する。

2) 8M尿素入り架橋比1:10 SDS 15% ポリアクリルアミド ゲルは表2に示した保存溶液

Table 1. Preparation of SDS polyacrylamide gel (cross-linkage 1:37)

Stock solution for the polyacrylamide gel	
a. 0.2% SDS in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.3	
b. Bis-acrylamide solution (30%)	
acrylamide	66.6 g
N, N'-methylene bis acrylamide	1.8 g
Distilled water	to 100 ml
c. 1.5% Ammonium persulfate solution	
d. TEMED solution	

Table 2. Preparation of 8 M urea SDS 15% polyacrylamide gel (cross-linkage 1:10)

Stock solution for the polyacrylamide gel	
a. 2% SDS in 1 M phosphate buffer, pH 8.3	
b. Bis-acrylamide solution	
acrylamide	33.3 g
N, N'-methylene bis-acrylamide	3.3 g
Distilled water	to 50 ml
c. 1.5% Ammonium persulfate solution	
d. TEMED solution	
e. 3% Potassium ferricyanide solution	

を混合して作成した。a: 1.5 ml, b: 6.75 ml, c: 1.5 ml, d: 0.045 ml, e: 0.1 ml, 尿素: 14.4 g を混合し蒸留水で 30 ml にする。

泳動装置：ミツミ科学産業 KK の SJ-1060 D 型ディスク電気泳動装置と東洋科学産業 KK IIC 定電圧装置を用いた。

操作法：試料抽出液は試料緩衝液と 1:1 の割合で混合し、その 1 ml に対し SDS 10 mg を加え、40°C 30分加温する。加温後、フルラム (1 mg/ml アセトン溶液) を同量加える。ただちに蛍光を発するので BPB 含有の 60% ショ糖溶液を同量加える。ポリアクリルアミド ゲル管の上に 20 μ l 加える。電極槽緩衝液は 0.05 M リン酸緩衝液 pH 8.3 にアジ化ナトリウム 0.02%, SDS 0.2% 添加したものをを用いた。泳動はゲル 1 本当り 5 mA とした。8 M 尿素入り高架橋比のゲルの場合 3 mA とした。BPB より \oplus 極にアミノ酸が易動するので注意しながら 1 時間半泳動した。検出はマナスライト 3650Å で照射し、記録後直ちにコダック Tri-X pan film を用いて東芝フィルター V-Y 43 をかけ接写した。

II 結果および考察

1. 試料緩衝液の影響：リン酸緩衝液で抽出した肉漿蛋白質に加える試料緩衝液にトリス緩衝

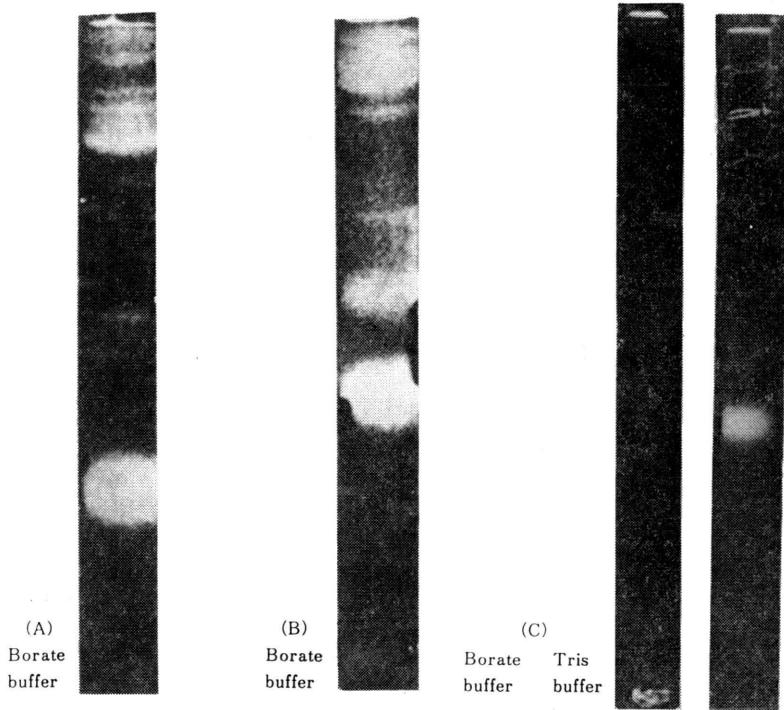


Fig. 1 Electrophoretograms of sarcoplasmic protein extracted from muscle sample immediately after slaughter.
 A : 15% acrylamide (1 : 37 cross-linkage) B : 30% acrylamide (1 : 37 cross-linkage) C : Blank test 15% acrylamide (1 : 37 cross-linkage)

液とホウ酸緩衝液を用いた場合の影響を検討した。0.4 M トリス緩衝液 (8 mM EDTA, 4 mM DTT, 1 M ショ糖 pH 8.3) とトリスのかわりにホウ酸ナトリウムを用いたホウ酸緩衝液を試料溶液に 1 : 1 の割合で加えた。分離ゲルは15%と30%、架橋比 1 : 37 のものを用いた。結果は図1に示した通り、15%ゲルの BPB より⊕極に近く光るのがアミノ酸で、⊖極に分子量1~2万以上の蛋白質のバンドが10本みられた。中間に存在するのがペプチドと思われる。30%ゲルはかたすぎて硝子管の間に隙間が出来て、きれいな結果が得られず適当と思われない。試料溶液を加えない場合、トリス緩衝液ではペプチド区分にフルラムトリスの蛍光がみられるがホウ酸緩衝液では生じなかった。ダンシルクロライドを用いた加藤⁴⁾の報告ではホウ酸でも⊕極にダンシル-OHの蛍光があり、トリスでは

ダンシルトリスとダンシル-OHと2本の蛍光が存在すると述べている。フルラムの場合はペプチド区分に蛍光が生じるのでトリス緩衝液は Table 3. Molecular weights of polypeptide employed in electrophoresis

Polypeptides	Molecular weights of polypeptide chain
1 Myoglobin	17,800
2 Lysozyme	13,930
3 Insulin	5,700
4 Insulin B	3,400
5 Val-Val-Val-Ala	997
6 Carnosine	226
7 Tryptophan	204
8 Histidine	155
9 Serine	105
10 Glycine	75

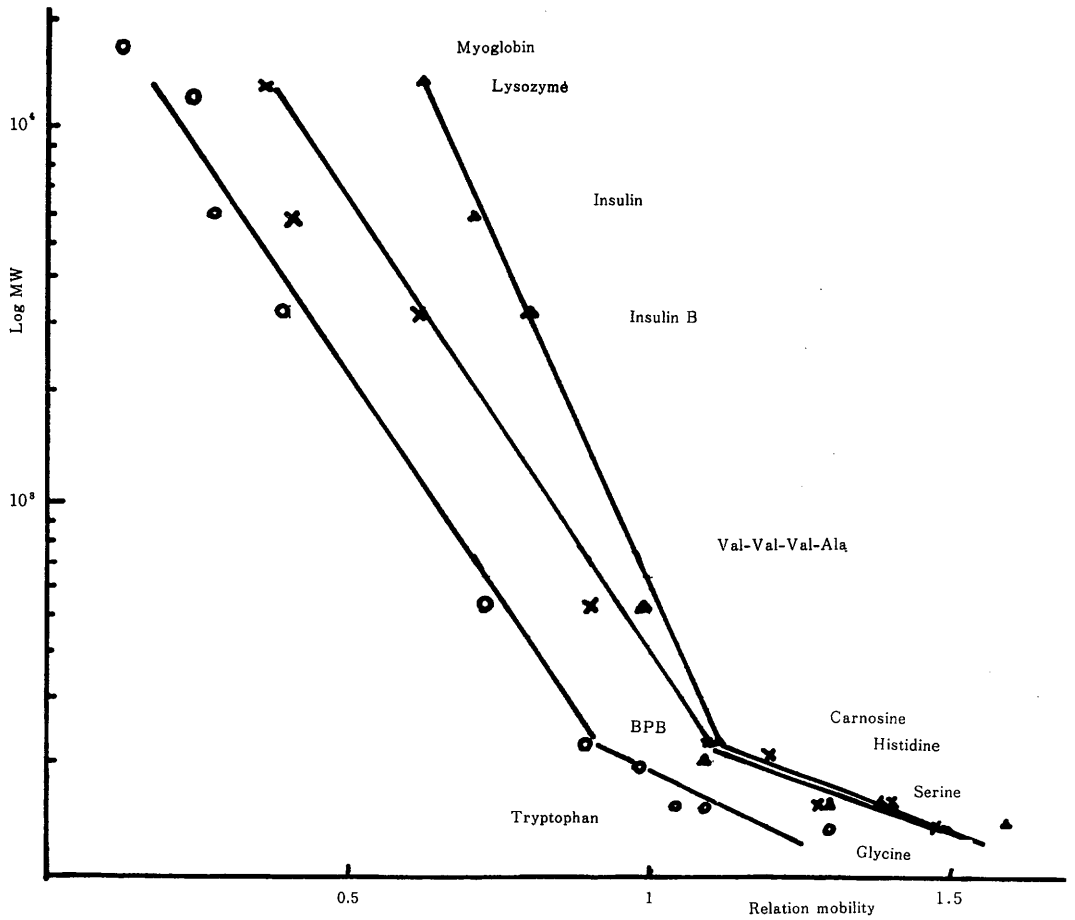


Fig. 2 Relative mobility vs. molecular weight, BPB as standard

- ▲ No urea, 15% acrylamide (1:37 cross-linkage)
- × No urea, 30% acrylamide (1:37 cross-linkage)
- 8 M urea, 15% acrylamide (1:10 cross-linkage)

使用出来ない。以下の実験ではホウ酸緩衝液を用いた。

2. 8 M 尿素入り SDS 15% ポリアクリルアミド ゲル電気泳動による標準物質の易動について：ペプチドの分離には高圧沝紙電気泳動が用いられるが、アクリルアミド ゲル電気泳動を用い、ゲル濃度や架橋比をかえてペプチドの分離をこころみている報告がある^{6),7)}。彼らは分子量130~12000のものを分離し、1000以上の

場合は分子量と易動度とが直線関係にある事を示している。1000以下の場合には種々問題のあることを示唆している。著者らは表3に示した標準アミノ酸、ポリペプチドを架橋比1:37の15%および30%ゲルと架橋比1:10の8M尿素入り15%ゲル3種類を用いて泳動し、BPBとの易動を比較して易動度を求めた。加えた尿素はアクリルアミドに加えるビスの増加による不透明化を防ぐためとペプチドの易動をおくら

No urea. (15% gel)

8 M urea. (15% gel)

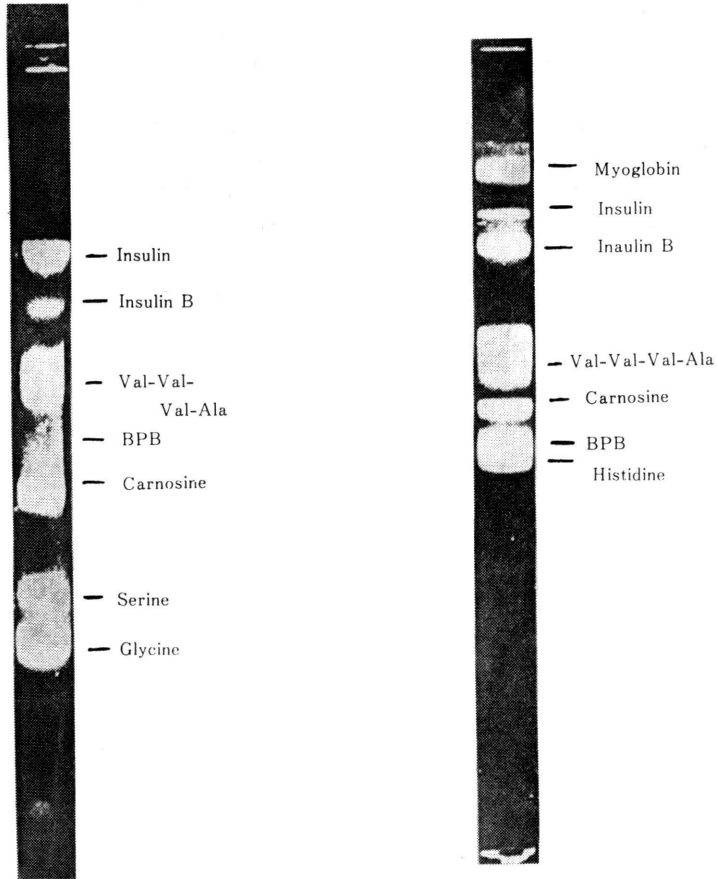


Fig. 3 Electrophoretograms of standard amino acids and polypeptides.

せ、分離をよくする為である。フェリシアン化カリの添加は、ゲルの重合を遅延させる。マナスライト照射後の泳動写真を図3に示した。分子量と易動度との関係は図2に示したがいずれもカルノシンより分子量の大きいポリペプチドは直線上に乗ったがアミノ酸は直線よりはずれた。15%および30%ゲルの場合にはカルノシンがBPBより⊕極に易動したが、尿素入り15%ゲルの場合にはおけている。カルノシンとミオグロビンの易動の差は尿素入り15%ゲルと30%ゲルは大きかったが15%ゲルでは小さかった。前にも述べたが、30%ゲルは結果の判定に正確さをかくので、分子量13000以下のペプチドの分離確認には、8M尿素入り15%ゲルが

適していると思われる。標準アミノ酸のゲル添加濃度は8.2μgで、ポリペプチドは分子量に比例して採取量を増加した。

なお、フルラムはα-アミノ基に反応するが酸性ペプチド、親水性側鎖を持つペプチドでは蛍光が弱いという。アンモニアとは蛍光物質を作らない点、ダンシルクロライドより有利である。ペプチドの反応を利用した蛍光定量法も開発され、アミノ酸自動分析器にも利用され今後増々蛍光試薬の使用が増加すると思われる。

懇切なる御指導を賜った東京大学名誉教授藤巻正生先生に深謝いたします。なお本実験に御協力下さいました萩原三千代、伏見京子氏に謝意を表します。

LITERATURE CITED

- 1) Rees, V. H., Fildes, J. E., Laurence, D. J. R. : J. Clin. Pathol., **7**, 336 (1954)
- 2) Weber, G. : Biochem. J., **51**, 155 (1952)
- 3) Bohlen, P., Stein, S., Dairman, W., Udenfriend, S. : Arch. Biochem. Biophys., **155**, 213 (1973)
- 4) 加藤泰治, 佐々木実: 蛋白質核酸酵素, **21**, 755 (1976)
- 5) 松本照代, 北村陽子, 藤卷正生: 栄養と食糧, **29**, 199 (1976)
- 6) Swank, R. T., Munkres, K. D. : Anal. Biochem., **39**, 462 (1971)
- 7) Dunker, A. K., Rueckert, R. R. : J. Biol. Chem., **244**, 5074 (1969)
- 8) R. Katakai : J. Org. Chem., **30**, 2699 (1975)