

冷凍魚ドリップの SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (2)

齊藤 芳枝

(昭和58年9月17日受理)

SDS Poly acryl amids Gel Electro phoresis of Frozen Fish Drip

Yoshie SAITO

(Received September 17, 1983)

緒 論

魚類のタンパクについては数多く報告があるが、そのうち魚類の品質¹⁾および種族の生化学的判別²⁾また水産食品の鑑定³⁾等に魚肉タンパクを利用した報告がある。関⁴⁾は魚肉タンパクを尿素抽出により SDS 電気泳動を行って種別判別の利用の報告を行っている。しかし冷凍魚のドリップのタンパクについての報告はないようである。著者は先にゲル⁵⁾とゲル電気泳動⁶⁾について報告した今回は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い含有タンパクを明らかにしたい目的で実験を行い結果を得たので報告する。

実験方法

1. 試料および試料調製

冷凍魚のエボダイ、オヒョウ、銀ダラ、サケ、マグロ、ムキカレイ、メルルーサ、ワカサギ等のドリップは室温(18°C)で自然解凍しドリップを得た。粘度、濃度が魚種によって異なるので、エボダイ、オヒョウ、メルルーサ、ワカサギ、銀ダラ、マグロは10~100倍に希釈し、サケは100~150倍にムキカレイは40倍に希釈して3000回転で10分間遠心分離し、その上澄液を試料液とした。

2. SDS ポリアクリルアミド電気泳動

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は関⁶⁾の方法により行った。すなわち次の通りである。

1) 保存溶液の調製

保存溶液Ⅰ：22.2%アクリルアミド(モノマ)-0.6% BIS 冷暗所に保存する。

保存溶液Ⅱ：0.5 Mリン酸ナトリウム緩衝液(PH 7.2)

保存溶液Ⅲ：10% SDS

保存溶液Ⅳ：50%グリセリン-2% SDS-0.02 Mリン

食品学研究室

酸ナトリウム緩衝液(PH 7.2) Ⅱを 2 ml, Ⅲを 10 ml, グリセリンを 25 g に水を加えて全量を 50 ml とする。
保存溶液Ⅴ：0.05% BPB

2) ゲルの調製

10%アクリルアミド・0.1% SDS ゲルを調製した。順序は図1の通りである。全量 30 ml をつくる割合は容量 100 ml の⁷⁾₁の⁸⁾に過硫酸アンモニウム, 22.5 mg, H₂O, 10.2 ml, 保存溶液Ⅰ 13.5 ml, 保存溶液Ⅱ 6.0 ml 以上を加えて良く攪拌混合する。(多量にゲルを調製したい場合は、このままの混合割合で全量を増加させる。) ⁹⁾の¹⁰⁾の口をゴム栓で閉じて脱気する、次に氷中で冷却し、TEMED を 0.045 ml 加え混合し、ガラスカラムに分注する(カラム上端は 1.5 cm 残す)次にこの上に水 5 mm の高さに重層する。

3) 試料泳動液の調製

1により得た試料液に保存溶液Ⅳと等量に混合し、2メルカプトエタノールを終濃度が1~5%になるように加えたのち、室温に一夜放置する。これを試料泳動液とする。

4) 泳動

まず 0.1% SDS-0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液を調製する。保存溶液Ⅱを 100 ml と保存溶液Ⅲを 5 ml これを加え全量 500 ml とする。カラム泳動装置にセットする。ゲル上の水を除き、保存溶液Ⅴ(BPB)を 2 μ l 入れ試料溶液をゲル上に静かに入れ泳動用緩衝液を重層する。図1の通り上を陰極に下を陽極にして泳動開始する。電流はカラム当り 8 mA を流す。12本カラムなら 8 \times 12=96 mA が流れるようにセットする。(ゲルカラム用ガラス管は内径 5 mm, 長さ 10 cm, 12本を使用した。)

5) 染色および脱色

染色液は0.12%コマジープリリアントブルー-50%メタノール, 9.2%酢酸を用いる。ゲルを染色液中に入れ

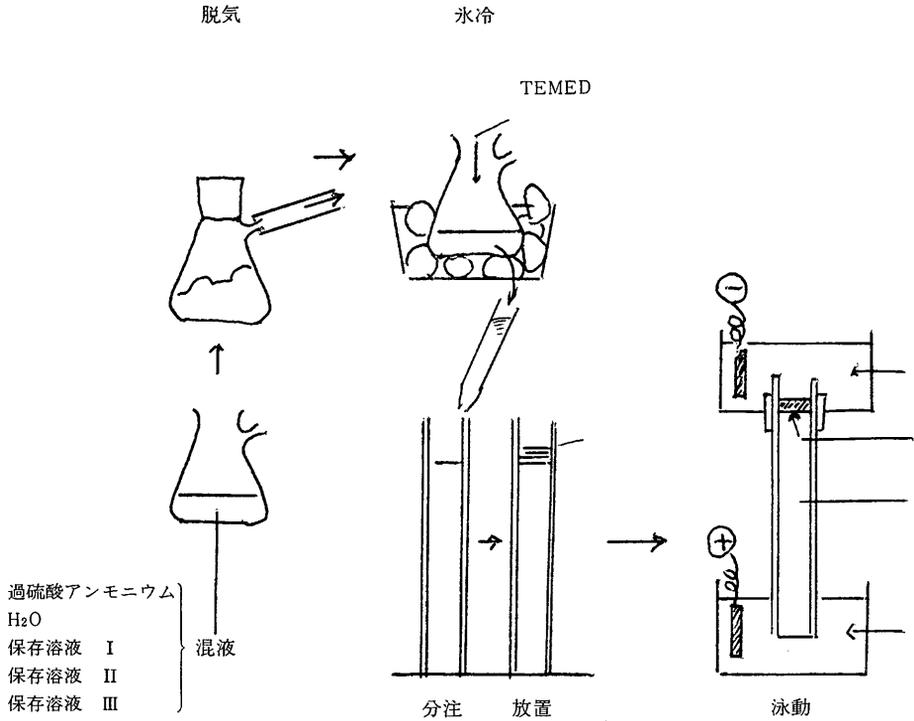


図1 操作方法の概略

最低2時間または一夜染色する。

脱色は脱色液(50%メタノール・7.5%酢酸)に入れ、8~10時間室温に放置したのち、7%酢酸にとりかえさらに半日程放置する。脱色の終わったゲルは7%酢酸中に入れ保存する。

6) 相対易動度の測定と分子量の検定

相対易動度は次のように計算する。

$$\text{相対易動度} = \frac{\text{タンパク質バンドの移動距離 (mm)}}{\text{BPB の移動距離 (mm)}}$$

それぞれ分子量既知のタンパク質の相対易動度を計算す

る。横軸に相対易動度を、縦軸に Log (分子量) をとって検量線を求める。この検量線を基にして試料のタンパク質の分子量を推定する。

実験および結果

1. 検量線作製

ミオクロビン、キモトリプシノーゲン、アルドラーゼ、卵白アルブミン、カタラーゼを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行って検量線を作製した。表1. 図2の通りである。

表1 タンパク質の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動
相対易動度 (Rf)

タンパク質	分子量 × 10 ⁻⁴	log (分子量 × 10 ⁻⁴)	Rf
ミオクロビン	1.7	0.230	0.72
キモトリプシノーゲン	2.57	0.410	0.56
アルドラーゼ	4.0	0.630	0.37
卵白アルブミン	4.3	0.633	0.36
カタラーゼ	6.0	0.778	0.22

冷凍魚ドリップのポリアクリルアミド電気泳動

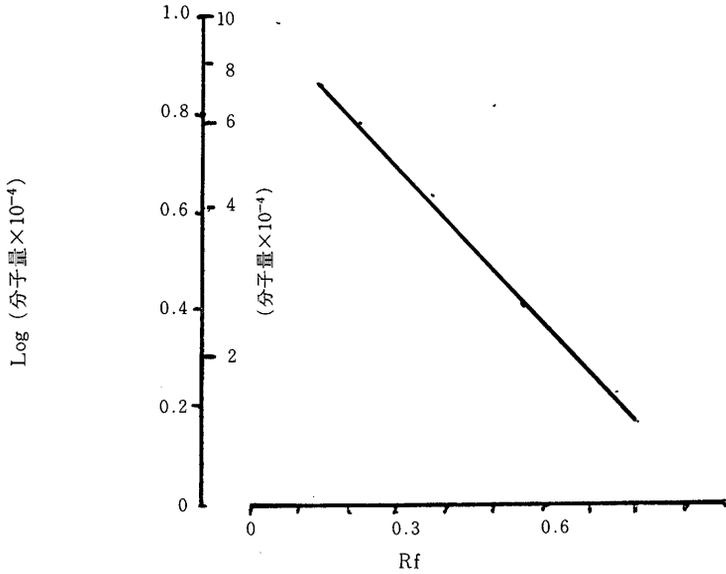


図2 検量線

2. 冷凍魚ドリップの SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動
 ワカサギ, マグロ, ムキカレイの冷凍魚のドリップを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った結果は エボタイ, オヒョウ, 銀ダラ, サケ, メルルーサー, 表2 (1-8) 写真1, 図3の通りである.

表2 ドリップの SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動および検量線より求めたタンパク質の分子量

表2 (1) エボタイ

	1	2	3	4	5	6	7	8	平均	Rf	Log	分子量 × 10 ⁻⁴
1	13		13		13	14	13	13	13	0.16	0.825	6.69
2	16											
3	18		19		18		19	19	19	0.23	0.760	5.76
4	22			20	20	20			20	0.24	0.751	5.64
5	27			26	25	26	25	25	26	0.32	0.679	4.78
6	31		30	30	30	30	30	31	30	0.37	0.630	4.26
7			35	35	34	35	34	34	35	0.43	0.572	3.73
8		39										
9	43		47		47	48	47	47	47	0.57	0.442	2.77
10	57			58								
11		62	62	64	64	64	62	63	63			
12		66								0.79	0.238	1.73
13		68	65	67	66	67	65	66	66			
B P B	77	78	82	83	85	84	83	82	82			

齊藤 芳枝

これらを検量線より魚類に含まれる蛋白質を推定した シン, アクチン, アクトミオシンと推定できる蛋白質が
結果は図3 (1~8)の通りである. 全ての魚種にミオ みられた. (・ページ参照)

表2 (2)

オ ヒ ヨ ウ

	1	2	3	4	5	6	7	8	平均	Rf	Log	分子量 ×10 ⁻⁴
1	1	1	1	1	1	1		1	1	0.01	0.973	9.40
2	9	10	9	10	9	10	9	10	10	0.12	0.865	7.33
3	11	12	11		11	12	12		11	0.13	0.859	7.23
4	12	13	12	13	13				13	0.16	0.825	6.69
5	14	15	14		15		15	15	15	0.18	0.808	6.43
6					17	17	17	17	17	0.21	0.780	6.03
7	19	19	18	20	19	18	21	18	19	0.23	0.760	5.76
8	24	26	24	25	23	23	24	22	24	0.29	0.705	5.07
9			29		27	26	26	26	26	0.32	0.680	4.79
10	31	32		32	32	32	32	32	32	0.39	0.610	4.08
11	36		34	36	35	34		34	35	0.43	0.573	3.74
12	38	38	37	39			38		38	0.46	0.545	3.51
13	41	41	41	43	41	40	42	40	41	0.50	0.510	3.24
14	45	45	44	46	45	43	46	43	45	0.55	0.470	2.95
15	51	49	49	51	50				50	0.61	0.407	2.55
16	63	66	61	63	59	58	57	60	61	0.74	0.285	1.93
17	76	81	74	76	78	72	72	76	76	0.93	0.105	1.27
B P B	82	86	79	81	85	80	81	82	82			

冷凍魚ドリップのポリアクリルアミド電気泳動

表 2 (3)

銀 ダ ラ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	平均	Rf	Log	分子量 × 10 ⁻⁴
1	10	9	10		11	9	10	10	11	10	11	10	0.114	0.870	7.42
2	13	12	13	12		12	13	13	14			13	0.148	0.840	6.92
3	16	15	15	14		15		15	16		15	15	0.170	0.818	6.58
4	18	17	17	18	18	17	17	18	18	18	17	17	0.193	0.795	6.24
5	21	21	21	22	25	21	21	21	22	21	22	21	0.239	0.750	5.63
6	27	26	27	28	29	27	27	27	28	28	28	27	0.307	0.690	4.90
7	31	31	31	32	30	31	31	31	32	32	33	31	0.352	0.645	4.42
8	33	33	33	35	35	33	33	33	33	34	35	33	0.375	0.625	4.22
9	38	38	37	39	38	37	38	38	38	38	39	38	0.432	0.570	3.72
10	41	40	41	42	45	41	41	41	41	41	42	41	0.466	0.540	3.47
11	47		47	48	48	46	47	47	47			47	0.534	0.476	2.99
12	50	50	50	51	50	50	50	50	51	51	52	50	0.568	0.443	2.77
13	54							54	54			54	0.614	0.403	2.57
14	70		70	71		71	71	70	70	70	70	70	0.795	0.232	1.71
15	80	80	82	81	78	81	82	81	80	81	80	81	0.909		
B P B	87	90	90	90	83	83	90	90	85	90	90	88			

表 2 (4)

サ ケ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	平均	Rf	Log	分子量 × 10 ⁻⁴
1	11		10	8	9	10	10	10	11	10	10	10	0.110	0.874	7.48
2		17	19	17	18	18	19	19		19		18	0.198	0.792	6.20
3	21	20	21	22	19	20	21	21	21		20	21	0.231	0.760	5.75
4	24	22		23	22	24	24	24				23	0.253	0.740	5.50
5	25	24	25	26	26		25			25	26	25	0.275	0.720	5.25
6	29	27	28	29	29	27	27	27	28	29	29	28	0.308	0.690	4.90
7	31	30	31	33	32	31	31	30	31	32	32	31	0.341	0.660	4.57
8			34	35	35	34	34	34	35	36	36	35	0.385	0.615	4.12
9			37			37	37	37	39		39	38	0.418	0.588	3.87
B P B	81	77	95	93	88	95	91	95	92	94	95	91			

齊藤 芳枝

表2 (5)

ムキカレイ

	1	2	3	4	5	6	7	8	平均	Rf	Log	分子量 × 10 ⁻⁴
1	7	9	8	7	8	7	8	7	8	0.096	0.888	7.73
2	12		13			13	13	12	13	0.157	0.830	6.76
3	15	14	16	16	17	17	17		16	0.193	0.795	6.24
4	20	18	21	22	22	22	22	21	21	0.253	0.740	5.50
5	24	26	25	25	25	25	25	24	25	0.301	0.695	4.96
6	29						28	27	28	0.337	0.662	4.59
7		32	31	32	31	30	32	30	31	0.373	0.628	4.25
B P B	80	85	80	83	85	82	82	85	83			

表2 (6)

メルルーサー

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	平均	Rf	Log	分子量 × 10 ⁻⁴
1		5	8	6	5							6	0.067	0.913	8.19
2	16	16	16	16	15			15		15	15	16	0.178	0.810	6.46
3	21	21		20	22	22	21	21		20	20	21	0.233	0.758	5.73
4	25	26	25	24	26	25	25	26	26	25	23	25	0.278	0.719	5.24
5	28	29		28	29	28	27	30	28	28	27	28	0.311	0.685	4.85
6	32	33	34	32	33	32	31	33	32	31	32	32	0.356	0.644	4.41
7	60	61	60	58	63	61	60	61	62	61	59	61	0.678	0.343	2.20
B P B	88	82	90	82	92	94	94	95	95	95	96	90			

冷凍魚ドリップのポリアクリルアミド電気泳動

表2 (7)

ワカサギ

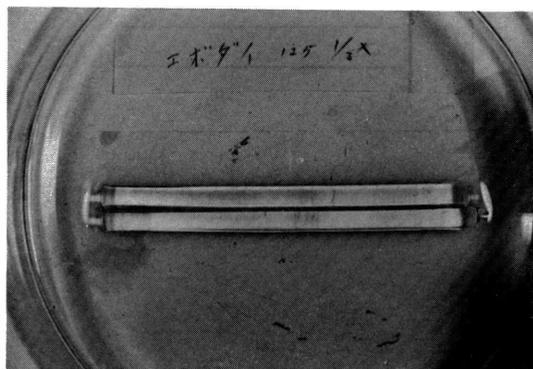
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	平均	Rf	Log ³	分子量 ×10 ⁻⁴
1	2		2	2	2	2	2	2	2	2	2	0.02	0.956	9.04
2	5	6	5	6		5	4				5	0.06	0.920	8.32
3	9	10	10		10	8	8	10	10	10	10	0.11	0.873	7.47
4	13		13	13			13				13	0.15	0.835	6.84
5	18	16	18	17	17	16	18	18	18	17	17	0.19	0.800	6.31
6	23	21	23	22	22	21	22	24	23	23	22	0.25	0.745	5.56
7	28	25	28	27	26	27	25	27	27	26	27	0.31	0.688	4.88
8	30	30	29	28	28			29	29	28	29	0.33	0.669	4.67
9	32	32	32	31	32	31		33	33	32	32	0.36	0.640	4.37
10	35		35	34		33	36		36	34	35	0.40	0.602	4.00
11				43			53				48	0.55	0.460	2.89
12			62	62							62	0.70	0.320	2.09
13			79	78	78	75	71			79	77	0.88	0.152	1.42
14								82	82		82	0.93	0.105	1.27
B P B	86		89	88	90	85	79	90	93	90	88			

表2 (8)

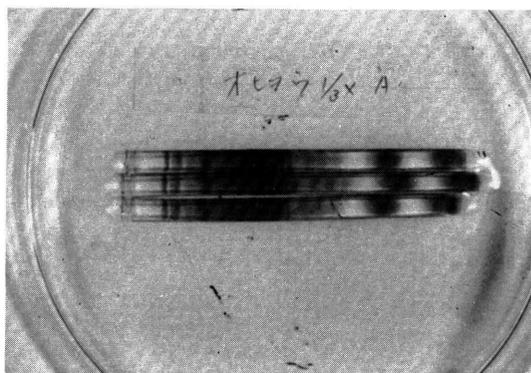
マグロ

	1	2	3	4	5	6	平均	Rf	Log	分子量 ×10 ⁻⁴
1	24	25	24	23	23	23	24	0.29	0.705	5.06
2	53	56	55	51	51	51	53	0.65	0.370	2.35
3	66	72	69	65	65	65	67	0.82	0.210	1.63
B P B	82	85	82	82	78	80	82			

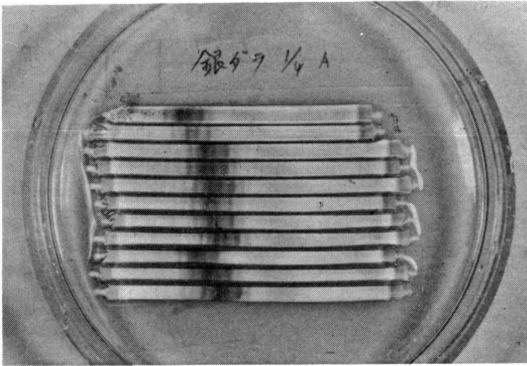
写真1 冷凍魚ドリップの SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動



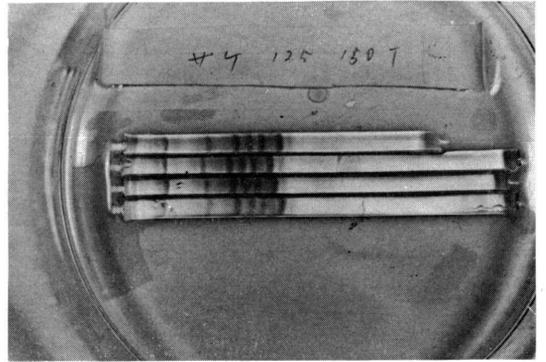
エボダイ



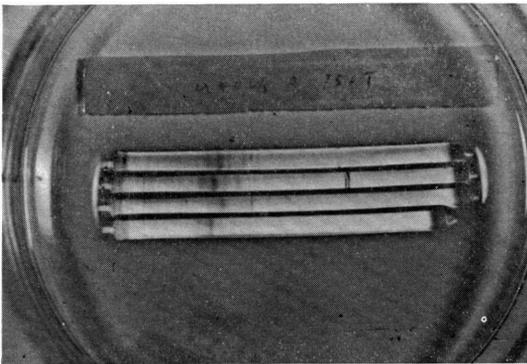
オヒヨウ



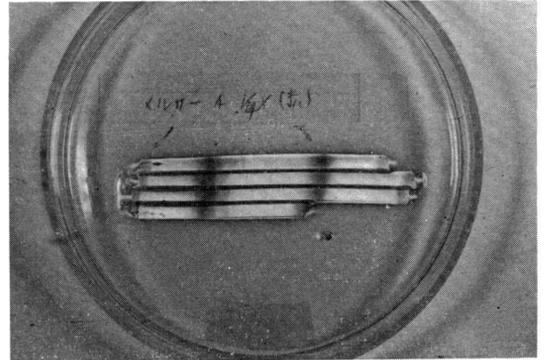
銀ダラ



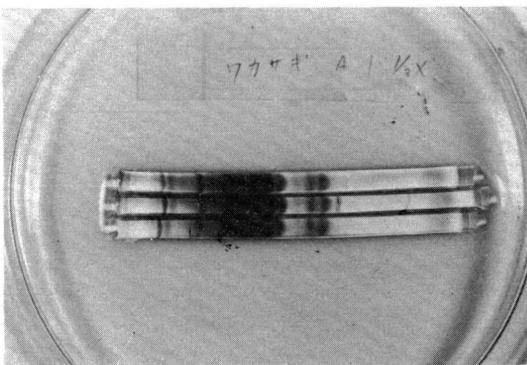
サケ



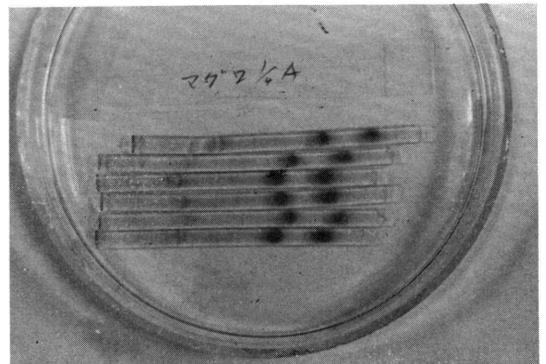
ムキカレイ



メルルサー



ワカサギ



マグロ

冷凍魚ドリップの SDS ポリアクリルアミド電気泳動

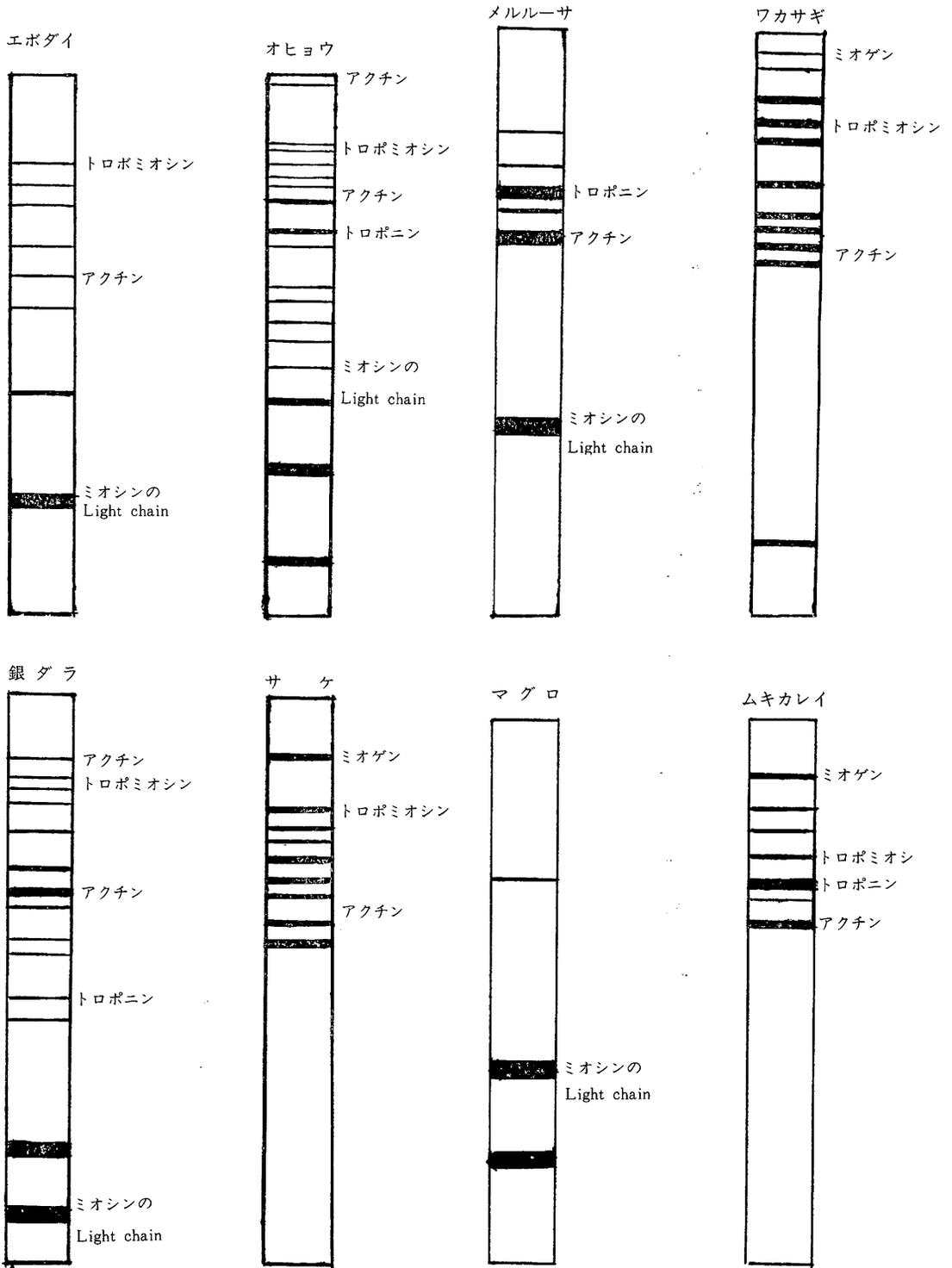


図3 冷凍魚ドリップの SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (検量線より判定した魚肉タンパク質)

考 察

10%のゲルではタンパク質の分子量15000~70000の範囲が適当である。魚肉中に含まれるタンパク質は表3の通りである。実験結果はこれらより推定したものである。また関はアクトミオシンをゲル透過と SDS ポリアクリルアミド電気泳動で行ったものによるとゲル透過では一つのピークにあらはれ、SDS ではいくつかに分離移動されていて、易動度の高いものは Light chain 低いものを heavy chain としている。今回行った実験結果は相対易動度から分子量を求め推定したものであるが、先の報告ではゲル透過では二つのピーク平板ゲル電気泳動では分離されず不明であったが SDS のこの実験では良く分離され既知の魚肉タンパクから推定することができた。しかしこれはドリップ中のタンパクである。ドリップ中にはこれらのタンパクが存在することが解ったが、魚肉中のタンパクの冷凍による変化については更に追究の必要がある。

表3 魚肉タンパク質の分子量

ミオシン	42万	
	カツオ	48万
	heavy chain	20万
	Light chain	2万
	コイ背筋 Light chain	2.5万 1.75万 1.6万
アクチン	7万	
	魚	4.2万
トロポミオミン	5.29万	
	魚	6.8万
トロポニン	魚	3万
	コイ	2.1万 1.9万
	サメ	5.8万
アクトミオシン	400~6000万	
ミオゲン	8~10万	

要 約

1. 冷凍魚のドリップを SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。
2. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は関伸夫²⁾の方法に順じて行った。
3. ゲル濃度は10%で行った、ドリップ中のタンパクは良く分離された、魚肉中のタンパクはこのゲル濃度が適当である分子量15000~70000である。
4. ミオシンの heavy chains ミオシンの light chains がアクチン、アクトミオシン等のバンドがみられた。
5. 泳動は魚種によって異っているが稍同じパターンである。冷凍による影響はあると思われるが今回の実験では解らなかつた。

この実験は53年度栄養学専攻卒の藤田幸子、市川陽子の両氏の卒業論文として共に行ったものでここに記して両氏に感謝いたします。また御助言をいただきました当研究室の吉野梅夫教授にここに同時に記して御礼申し上げます。

文 献

- 1) 新井健一：魚の品質、水産学シリーズ 4 日本水産学会編 恒星社厚生閣刊（東京）1974 p. 55~71
- 2) 谷口順彦：魚類種族の生化学的判別、水産学シリーズ 9 日本水産学会編、恒星社原生閣刊（東京）1975 p. 65~79
- 3) 関 伸夫：水産食品の鑑定 水産学シリーズ 29 1979
- 4) 魚肉蛋白質 水産学シリーズ 20 1977, p. 7~20.
- 5) 齊藤芳枝：家政大学研究紀要 投橋中
- 6) 齊藤恒行、山田均、梅本 滋、河端俊治：水産生物、食品学実験書 恒星社厚生閣 124~132, (1974)