

デンプンゲル電気泳動法実験テクニック(改訂版)

秋山 弘之¹⁾・鈴木 武²⁾

Starch Gel Electrophoresis for Botanical Research

Hiroyuki AKIYAMA¹⁾ & Takeshi SUZUKI²⁾

Key words: allozyme, isozyme, starch gel electrophoresis

1 はじめに

1-1 デンプンゲル電気泳動法の利点と欠点

ここに紹介するのは、デンプンゲルを支持体に用いた電気泳動法により、酵素タンパク質における変異(アロザイム多型 allozymic variation)を検出する手法である。この手法は進化学や生態学、分類学を専門とする研究室の多くで日常的に用いられており、通常の研究手段として確立されている。そのため、これまでに多くの解説書や技術書がものされているが、植物を対象として日本語で書かれたものは多くない。植物では一般に調査できる酵素や遺伝子座の数が動物に比べて少なく、よいデータを得るためにはさまざまな工夫が必要である。著者らの経験に基づいて、実験を行う上で役に立つであろう事柄について詳しく述べるのがこの小論の目的である。

アロザイム多型は、とりわけ形態的データと組み合わせた場合に、集団内あるいは集団間の遺伝的多様性を解析するのに優れた手法である。一方分類群間の分岐の順番、つまり系統を推定するには、遺伝子あるいは遺伝子間領域などの塩基配列を直接調べるのがより良い方法であることが明らかになっており、アロザイム多型は適さない。しかしながら、集団の遺伝的な性質を調べるといったような領域では、現在でも最も有効な手段の一つである。

欠点としては、サンプルの採集にかかる手間と費用、植物体の維持・管理、実験にかかる時間、解析の難しさ(とりわけ高次倍数体における複雑なザイモグラムの解釈)など、あらかじめ考慮しておくべき事柄が少なくない

いことがあげられる。手間と費用が思いのほかかかることにはとりわけ留意しておく必要がある。また、サンプルを生かした状態で保管するには、人手とスペースが必要である。つまらないことだが、多量のサンプルをすりつぶすため、腱鞘炎を患う研究者も少なくないことを付記しておきたい。

このような多くの欠点を持つ手法ではあるが、それと同時に非常に有効な研究手段であることも確かである。自分が何を知りたいのかを明らかにし、またデンプンゲル電気泳動法の利点と弱点を十分に検討した上で、この手法を実験手段として採用することが肝要であり、これは他の手法の場合と同様である。

なおこの資料は、蘚苔類について詳述した秋山(1991)を改訂したものである。おもな相違は、染色法についてこまかい改良を加えたこと、ならびに維管束植物に適した緩衝液システムに言及した点にある。実験を開始するに当たってどのような器具が必要となるかについては、秋山(1991)に詳しく述べられているので、予算について考える場合に利用されたい。また参考のために、泳動槽、ゲル作製板などを自作する場合の設計図を、図1~4として掲載した。

1-2 解析用プログラム

実験によって得られるのは、ゲル上に発色したバンドのパタン(ザイモグラム)である。これを対立遺伝子に読み替えなければならない。蘚苔類などの1倍体では、バンドの異同をそのまま対立遺伝子の異同として読み替えることができるため解釈が容易であるが、2倍体や高次

¹⁾ 兵庫県立人と自然の博物館 系統分類研究部 Division of Phylogenetics, Museum of Nature and Human Activities, Hyogo, Yayoigaoka 6, Sanda, 669-1546 Japan

²⁾ 兵庫県立人と自然の博物館 生物資源研究部 Division of Biological Resources, Museum of Nature and Human Activities, Hyogo, Yayoigaoka 6, Sanda, 669-1546 Japan

倍数体，とりわけ酵素が二量体，四量体である場合には，解釈が困難，時として不可能となる場合も少なくない。

いったん対立遺伝子として読み替えられると，その後はデータ解析用プログラムを用いて，集団の遺伝的性質を表す諸変数(He, Ht, Hs, Gst, D, I など)に関する推定をおこなう。一般に用いられているデータ解析用のプログラムとしては，

BIOSYS-1, Genestat-PC

の2つをあげることができる。前者は有料で配布を受けることができる。後者は，再配布自由のフリーソフトであったが，現在開発者からの配布は行われていない。

また最近，Genestat-PC開発者であるPaul O. Lewisによって，GDAというフリーソフトが配布されている。現在は評価版であり，信頼性はまだ保証されていない(筆者の経験では，1998年5月現在でまだかなりのバグがあるようだ)。入力データの構造はBIOSYS-1と共通であり(Nexus形式)，集団内・集団間についての様々な変数を計算させることができる。Biosys-1やGenestat-PC用の入力データファイルを出力することもできる。それだけでなく，NJあるいはUPGMAによるツリーをかかせることもでき便利である。このソフトはインターネットの下記のURLから入手できる。

<http://chee.unm.edu/gda/>

UPGMAあるいはNJ法によって得られたツリーを検定するには，分岐点の分散を計算する必要があるが，これは非常に面倒である。解析ソフトのパッケージであるPHYLIPIには，遺伝子頻度データを使ったブートストラップが可能なプログラムが入っているので，これを使ってツリーの検定を行うことができる。このソフトは下記のURLから入手できる。

<http://evolution.genetics.washington.edu/phyli.html>

2 実験手順

以下に実験の手順を列挙する。ストックしておくべき試薬，緩衝液等については，7章を参照のこと。維管束植物と蘚苔類で事情が異なる部分については，それぞれ(コケ)，(維管束)という記号を付して記述している。

2-1 泳動するサンプルの準備

2-1-1 サンプルング

集団の遺伝的性質を，誤差少なく推定するためには，現実に存在する集団からどのように泳動サンプルとなる個体を選び出すか，つまりサンプルリングデザインが重要である。精度の高い解析データを得るのはどれくらいのサンプル数が必要となるのか，あるいは調べるべき酵素種(遺伝子座)の数はどれくらい必要か，などについては，Richardson et al. (1986)や根井(1990)の教科書に

詳しく記述されているので参考にされたい。

植物種によっては，サンプルングの時期も大切な要素となる。たとえば，蘚類の一種オオミズゴケは，晩秋から冬にかけては細胞内の活動が著しく低下しているようで，ほとんどの酵素種で十分に発色することがない。そのため夏から初秋にかけてサンプル採取する必要がある。

2-1-2 サンプルの維持

(コケ)：蘚苔類の場合は，市販の試料用カップを使ったり，あるいはおかずパックのケースを再利用して，サンプルとなる植物を栽培する。基質としてミズゴケを利用すると水やりの必要がなく，また乾いて死なせることもなく便利である。ただし密閉した容器で栽培すると，植物体は徒長して本来の形態を失ってしまうので，証拠標本(voucher specimen)は別途に乾燥標本として作っておく必要がある。

蘚苔類は一般に腐りにくいので，もっと簡単には，ビニール袋に小分けして冷蔵庫で保管すれば，数カ月は持つことが多い。

(維管束)：採取したサンプルはできるだけ新鮮なうちに実験に用いるのが好ましいが，ビニール袋に入れて乾燥を防いで冷蔵庫で2-3週間ならば保存できることが多い。また-70度では長期保管することも可能であるが，失活しやすい酵素があったり，材料によっては不調に終わることもある。また比較する上で重要な個体は，植木鉢などで栽培しておく必要がある。

2-1-3 すりつぶし

2-1-3-1 すりつぶし緩衝液

対象となる植物によって，さまざまな「すりつぶし(抽出)緩衝液」が使われている。ここでは維管束植物，コケ植物に分けて記述する。

●維管束植物の場合

以下に示す標準的なすりつぶし緩衝液をまず試みることを勧める。

標準的なすりつぶし緩衝液 (Soltis et al., 1983)

0.1M Tris	12.11 g
10mM MgCl ₂ ·6H ₂ O	2.03 g
10mM KCl	0.74 g
1mM EDTA·4Na	0.45 g

これらを約900mlの蒸留水に溶かす。塩酸でpH7.5に調整し，その後蒸留水を加えて最終的に1000mlとして保存液とする。冷蔵庫で保管しておく。すりつぶしにはこの保存液を原液のまま使用する。使用する直前にこの保存液30ml(これで1回の泳動で処理できるサンプル数に対して充分な量)に対して

PVP(Sigma40T)	1.5 g
2-メルカプトエタノール	60 μl

を加えて冷やしておく。PVPはやや溶けにくく、マイクロスパーテルで軽くかき混ぜ、そのまましばらく放置しておく。

●コケ植物の場合(あるいはフェノール類の少ない場合) 保存液の調整

0.1M Tris-HCl (pH7.5)に以下のものを加える

EDTA・3Na	1.0 mM
塩化カリウム	10.0 mM
塩化マグネシウム	10.0 mM
Triton X-100	0.1 %

Triton X-100は原液が20%なので、保存液100mlあたり0.5ml添加する。これは界面活性剤であり、試料へのしみこみを助ける働きをする。なければ加える必要はない。

必要量(1サンプルあたり0.6-1.0ml)をストックからとりわけ、試料をすりつぶす直前に0.2%(w/v)のメルカプトエタノールを加える(30mlのすりつぶし緩衝液に対して60 μ l)。

この抽出緩衝液に、5%(w/v)のPVPを加える。溶けにくいので、すこしかき混ぜた後しばらく放置しておく。

●さまざまな応用例

①ミズゴケ類

ミズゴケには上記のすりつぶし緩衝液はあまり適しておらず、Cronberg (1994)は以下のように複雑な組成のすりつぶし緩衝液を使用して効果を上げている。参考のために原文のまま引用しておく。

100ml stock solution mix:

Germanium dioxide	0.093 g
Distilled water	65 ml

Boil to dissolve the GeO₂, and will allow to cool again.

DIECA	0.3 g
PVP, 40,000 M quality	4.4 g
Sodium ascorbate	0.44 g
Sodium metabisulfite	0.33 g
Sodium borate	1.21 g
Phosphate buffer, 0.1M, pH7.0	c.14 ml

(to volume of 90ml)

Allow subsatances to dissolve. Adjust pH to 8.0 with HCl.

Store as stock portions (4.5ml) in freezer.

Immediately before extraction, 4.5ml buffer is mixed with:

2-Phenoxyethanol	40 μ l
β -mercaptoetahnol	10 μ l
Dimethylsulfoxide (DMSO)	0.44 ml

After final additions the buffer volume is c. 5ml, which is usually enough for about 100 extractions;

the pH value is c. 7.5.

②維管束植物

植物体の量がきわめて少量かつすりつぶしやすい場合(前葉体や実生など)には、1.5mlの遠心用チューブに植物体とすりつぶし緩衝液を加えて、ペレットミキサーでつぶすこともある。

すりつぶし緩衝液の組成も重要である。特にPVPとメルカプトエタノールの濃度は効果が大きいといわれている。キク科のヒヨドリバナ属などでは0.2%(w/v)メルカプトエタノールでは不足で、粗抽出液がすぐに黒く変色してしまう。0.5%(w/v)メルカプトエタノールですりつぶせば、十分な活性が得られている。PVPの濃度に関しては、筆者はあまり良好な結果を得られたことがないので、今までのところすべて5%(w/v)で行っている。

タンポポ属など乳液の多い植物では、陰イオン交換樹脂であるDOWEXをすりつぶす際に1サンプルあたりマイクロスパーテル1杯加えると有効である。

(DOWEX: The Dow Chemical Company, 室町化学工業 250ml入り)

還元剤としてアスコルビン酸ナトリウムやピロ亜硫酸ナトリウムをさらに加える場合もあるが、筆者らの経験の範囲ではさほどの効果はなさそうである。

すりつぶし緩衝液にNADP・NAD(30mlあたり各5mg程度)を加えるとNADP・NAD依存性酵素の活性がよくなることもある。

2-1-3-2 すりつぶし

(維管束)植物体のどの部分でも生組織ならかまわないが、ほとんどの場合、若い葉が用いられる。生重量で0.1~0.2gあれば十分である。これにすりつぶし緩衝液約0.5~0.8mlと少量の石英砂を加えて、乳鉢と乳棒ですばやくすりつぶす。乳鉢は氷の上において冷やす必要はないが、すりつぶし緩衝液は氷を使って十分に冷やしておくこと。すりつぶしたサンプルにあまり流動性がない場合には、さらに少量のすりつぶし緩衝液を加える。

できたペーストを1.5mlの遠心用チューブにいれる。チューブの口はよく拭いておいて(拭かないと遠心の際に飛び散る)、ふたを閉めた後に砕いた氷の中にさしておく。数がそろったら(遠心器のローターの孔の数による)、15000rpm, 4℃で3分間遠心する。上澄み液を“粗抽出液”として電気泳動に使用する。この後については、[2-3泳動]の項を参照。粗抽出液は一晩程度なら、冷蔵保存できる。

(コケ)採取したコケのシュートはゴミや線虫などを取り除き、先端の若い部分のみを、合計がおよそ0.2g程度になるように1-15本とりわけると。この際に同一の個体からのシュートであることを確認すること。すりつぶ

し緩衝液を適量(0.6–1.0ml)と少量の石英砂を加えて、乳鉢の中で丁寧にすりつぶす。コケ植物の細胞壁は固く破壊されにくいので、十分にすりつぶすこと。はじめは十分に破碎されていることを顕微鏡を使って確認することが望ましい。

すりつぶして得た粗抽出液の上に、小さく切ったキムワイブを載せ(これは簡単なフィルターの役目を果たす)、そこに濾紙片を置く。濾紙片に十分に液が吸い込まれたら、番号を記入した1.5mlエペンドルフチューブに入れ、砕いた氷の中にさしておく。このとき多量に吸い込ませると、隣に並べる濾紙片との間でしみ出た粗抽出液が混じることになるので注意する。

この方法は比較的高価な冷却遠心器を使用できない場合に便利である。コケ類を扱う研究者では一般的な方法で、筆者らの経験でも問題は生じていない。

濾紙片には、東洋濾紙(株)のペーパークロマトグラフ用濾紙の最も厚いタイプ(製造番号585)を、幅3–4 mm、長さ15mmに切って用いる。大量に使うことになるので、あらかじめたくさんつくっておくとよい。

2-1-3-3 サンプルの保管

粗抽出液あるいはそれを染み込ませた濾紙片は、-70℃以下で比較的長期間保存することができる。目印となる記号を書き込んだエペンドルフチューブなどを使って保管しておくが良い。ウルトラディープフリーザーが利用できるのであれば、すりつぶし作業と泳動をおこなう日を分離でき便利である。ただし、家庭用冷蔵庫の冷凍庫は保管には適さない(コケ植物の場合、IDHやACNといった酵素は一晩で容易に失活してしまう)。

2-2 ゲルの作製

電気泳動の支持体としてのデンプンゲルはいろいろ状である。作成の際には、熱い湯状のデンプン湯が飛び散り、火傷の危険があり、きわめて注意を要する。またマニュアルを読むだけで作成することはほとんど不可能であるので、指導を受けることを勧める。

デンプンゲルの作製は、500mlゲルの緩衝液に通常58 gの水解デンプンを加える(水解デンプンは吸湿してカビが生えやすいので、冷蔵庫で保管する)。これを100℃近くに加熱すると、ほぼ透明で流動性のある液体状となる。アスピレーターを使用して脱気し、ゲル作製板(図3)に注ぎ込むことによってデンプンゲルを作製する。室温でしばらく放置すると、白濁した不透明でいろいろ状のデンプンゲルができる。

この量ではゲル枠よりもかなりゲルが盛り上がるので、1.5mm厚のかさ上げ枠(図4)1枚をのせてつくることが多い。かさ上げ枠はビニールテープなどで各辺をゲル枠につけておかないと、熱で反り返ることがあるので注

意。

実際にデンプンゲルをつくるには以下のふたつの方法がある。

方法A

1. 使用する緩衝液500mlを1000mlろ過フラスコ(PYREX, 5340FK1000)にいれる。ここに水解デンプン58gを投入し、よくかき混ぜる(デンプンを入れたまま放置すると、ダマができて失敗することになる)。
2. ろ過フラスコをガスバーナーの直火、あるいは石綿つき金網の上で加熱する。デンプンが透明になるまで、掻き混ぜながら加熱してゆく。この間およそ15分ほどである。
3. なかば透明になったらろ過フラスコの口に大きめのゴム栓をあてがい、アスピレーターを用いて脱気する。小さな泡がなくなりすべての泡が大きくなったら、十分に脱気できている。これらの作業には火傷を避けるために耐熱ミトン(後述)を使う。
4. 脱気が終わったら、素早くゲル作製板にそそぎ込む。このゲル作製板にはあらかじめかさ上げ用の縁取り枠(図4)を少量の水を接着剤としてしっかりと張り付けておく。そそぎ込んだゲルの中に気泡やダマがあるとき、それらが少ない場合にはピペットやマイクロスポイトなどで取り除く。ゲルが熱く透明な間はかなり大胆に扱っても大丈夫である。あまりにダマなどが多くいわゆる「霜降り」状態になってしまった場合は、あきらめてはじめてから作り直すこと。
5. ゲルがある程度冷えて表面が硬くなったら、乾かないように全体をラップで覆う。このときにしわが寄らないように注意する。

方法B

1. 1000mlのろ過フラスコ(PYREX, 5340FK1000)に計量したデンプンを入れ、ゲル緩衝液500mlのうち150mlを注いで、すぐにフラスコの上部をつかんで回すようにすばやくデンプンを懸濁する。1分もすればたいていは十分である。残り350mlの緩衝液は500mlの平底フラスコ(PYREX, 4060FK500)に入れてガスコンロで加熱する。
2. 平底フラスコの緩衝液が沸騰しそうになったら、耐圧ゴム管でアスピレーターとろ過フラスコをつないで、アスピレーターを作動させる。両手には厚手の耐熱手袋(「キッチンミトン」という名称で台所用品売り場にある。防水性のものを使う)をつける。ろ過フラスコの首をもち、もう一度かきまぜてデンプンが底に沈澱していないことを確認する。
3. 以下の作業は、すばやく行わなければならない。また熱湯で火傷の危険があるので、気合を入れてすること。ガスを止めて、平底フラスコの首をもち、軽く

ゆする。一気に沸騰状態となるが、これをしないと突沸の危険がある。左手にろ過フラスコ、右手に平底フラスコの首の下側をもつ。ろ過フラスコをしっかりとゆすりながら、平底フラスコの首をろ過フラスコに入れ込んで、一気に加熱した緩衝液を注ぐ。これと同時に激しく全体を振ってかき混ぜる。緩衝液が全部はいるのをまってはならない。

白濁したデンプン懸濁液が一気に半透明となる。緩衝液が全部入ったら平底フラスコを取り除いて、ろ過フラスコの口に大型のゴム栓をあてて、30秒くらいすばやく激しくかき混ぜる。

この後は、方法Aの3以下と同様である。

ゲルは泳動開始前に作成し、冷蔵庫で十分に冷やしておく。泳動・染色する当日が忙しくて十分な時間がとれない場合、前日の夕方にゲルをつくっておくこともできる。ただしこの場合、ゲルを冷蔵庫に置いておくと、翌日までに固くなり過ぎてしまうので、サララップで表面を覆い、室内に放置しておくこと。

まれにロットにより水解デンプンの性質が異なる場合があり、そのときには上記の58 g(これでおよそ11.5 % (w/v)のデンプンゲルとなる)にこだわらずに、水解デンプンの量を調整する必要があることもある。

2-3 電気泳動

2-3-1 電気泳動の準備

電気泳動は4~6℃で行う。サンプルをゲルに入れる前に、泳動槽側の電極槽にそれぞれ泳動用緩衝液を約500mlずつ加えて、冷蔵庫または冷蔵室に入れて冷やしておく。また泳動用緩衝液とゲルを電気的につなぐブリッジとして、合成セーム皮を泳動用緩衝液に浸しておく。合成セーム皮は自動車磨き用に売られている。筆者らはカネボウ製の「プラスセーム」標準サイズ302(自動車用品店で購入できる)を約20×15cmに切って2枚を重ねて用いている。

泳動中にゲルは多少とも発熱するが、冷蔵庫内の冷気で十分に冷やせない場合は、ゲル板の上に冷却剤(アイスノンなど)や氷を入れたタッパーをのせればよい。

2-3-2 デンプンゲルに切れ目を入れる

完成したゲルの大きさは20×18cmで9 mm厚である。これに切れ目をつくり、粗抽出液をしみこませたる紙片を入れる。

ゲルにかかったラップの一部をめくり、ゲルの手前から3 cmの位置にものさしまたはガラス板をあてて、ケーキ作成用の金属へらでゲルを切断する。この時、ゲルの底に達するまで切れ込みを入れておく。左手人指し指・中指をゲル表面の切断面をはさんで軽く置いて広げると、すき間ができる。蒸留水で軽くぬらした右手人指し指を

このすき間にいれて、切れ目をなめらかにしておく。

2-3-3 濾紙片の挿入

粗抽出液をすでに濾紙片にしみこませている場合は、そのまま番号順に濾紙片をゲルの底まで届くように、デンプンゲルの隙間に挟み込んでゆく。濾紙片が底面までとどくと軽い抵抗感があるのでわかる。また底面から見ても確認できる。このとき濾紙片が5個から7個の組になるようにはさんでゆくと、組として認識しやすく、後でバンドの読みとりが容易である。また濾紙片同士を接触させると、良い結果が得られないので、ある程度は離してさしこんでゆくこと。デンプンゲルを18cm幅で使用すると約30サンプル、20cm幅では約36サンプルの泳動が可能である。

粗抽出液をエッペンドルフチューブで遠心してその上澄みを用いる場合は、ここで前出の濾紙片を用意する。濾紙片をピンセットではさみ、先端を粗抽出液につけて吸わせる。すぐに引き上げること。液を吸わせすぎると、濾紙片が柔らかくなって挿入しにくくなるし、余分な液がゲルに流れ出して実験データに混乱をきたす。

デンプンゲルの両端には、マーカー用色素ブロムフェノールブルー(BPB)を染み込ませた濾紙片をはさむ。BPBマーカーをつくるには、Bromphenol Blue (Sulfone Form, Sigma B0126)を、95%エタノールを溶媒にして4%溶液をつくり、これにウィックを浸して乾かす。

デンプンゲルの両端は電流が一樣に流れず泳動にゆがみが生じやすいので、ゲルの左右1 cm以上はかならず空けておくこと。

サンプルの挿入が終わったら、切れ目に近い側のゲル枠とデンプンゲルの間にヘラを使って隙間を確保し、その隙間に幅10mm、厚1.5mm程度の棒(アイスクリームの棒が便利)を差し込んで、切り離されて濾紙片を挟み込んだゲルがよく密着するようにする。

2-3-4 泳動槽へのセット

サンプルに近いほうを陰極側にするようにして、冷蔵庫の泳動槽にゲルをおく。泳動用緩衝液がしみこんだブリッジ用セーム皮を、ゲルに3 cm程度重なるように両極側でかける。ゲルとブリッジの間に隙間ができないように注意する。陰極側ではブリッジは濾紙片のぎりぎりまでくるが、接触はしないよう注意する。ゲルの乾燥を防ぐため、ラップは、ブリッジ上部や濾紙片も含めてゲルにかけておく。

適当な泳動条件(定電流あるいは定電圧で行う；後述の泳動条件の項を参照)で電気泳動を開始する。15~30分後に濾紙片を抜き取る。抜き取るのを忘れると、泳動に重大な支障が生じる。またこの作業は、必ず電源を切ってから行うこと。泳動条件によっては高い電圧がかかっ

ていて、非常に危険である。

濾紙片を抜き取った後、必要ならば陰極側のゲル枠とゲルの間にさらに幅10mm、厚さ1.5mm程度の棒を入れる。

2-4 ゲルのスライス

泳動が終わったデンブングルをゲル作製板ごと冷蔵庫から取り出し、ラップをはずし紙を使って表面についた緩衝液をよくふき取る。

かさ上げ用枠をはずす。

デンブングルの不要な部分を切り取る。酵素タンパク質はマーカーよりも流れるのがずっと遅いので、マーカーが達したところより2cmほど手前で切る。ゲルが不必要に大きいままだと、余分な染色液が必要となるし、取り扱いが難しくなる。このとき、ゲルの右上の角を切り落として、ゲルの左右、裏表が確認できるようにしておく。

糸のこ切りに、刃のかわりにギター弦を張ったものを用意する(ギター用の一番細い弦を使う。太さは0.008~0.010mm程度。楽器屋で容易に入手できる)。ゲルをゲル作製板にいれたまま表面の部分を切り取る。このときゲルの上にガラス板を2-3枚重ねた重石を載せる。最初に切り取ったゲルは染色には用いない。

切り取った面を下にして、ゲルスライス用の板にゲルを移す。ゲルにガラス板の重石を載せて、順次スライスしてゆく。

ゲルを切るときは、

- 1 力を均等に掛ける
- 2 重石のガラス板には指を添えるだけで、力は加えないこと
- 3 糸のこ切りの弦をゲルに挿入するときには、特にゆっくりと注意深く行う
- 4 切り取られてるゲルの厚さを目で確認しながら切ること

に注意する。この作業が実は一番難しい。今までの努力が無にならないように、慎重に作業すること。ゲルスライス用の板のレールの高さにもよるが、一枚のゲルから6-8枚のスライスがとれるはずである。

切り取ったゲルは各々の染色法に従って染色用のガラス板に載せるか、あるいは染色用のタッパーに入れる。薄いゲルはちぎれやすいので注意して丁寧に扱う。

ゲルを載せるガラス板は、ゲル作製板の大きさ、あるいは横方向、縦方向のどちらを使って泳動したかによって、その大きさを決める。

横使用 15×23×2mm

縦使用 18×21×2mm

乾燥用ガラス板もこれに連動して大きさが違う。

横使用 11×23×2mm

縦使用 12×20×2mm

切ったゲルを規格品の大きさのガラス板の上一枚ずつ並べる。このとき、あらかじめガラス板の上に霧吹きで水をかけておくと、薄いゲルがよれなくて具合がよい。ガラス板の右上にはビニールテープを貼り付け、そこにそれぞれ染色する酵素の名前を書き記しておく。

スライスしたゲルは、多少の時間であれば室内に放置しておいても良いが、乾かないように注意する。

2-5 活性染色法

粗抽出液にふくまれている様々なタンパク質は、その電荷とゲルの分子篩効果により、デンブングル中に分離されている。しかし、その量はごく少ないので、クマシンプルーなどによるタンパク質の染色法ではバンドとして検出できない。また、一遺伝子座に由来する変異を検出したいのであるから、タンパク質の総検出法は我々の目的には適していない。

そこで活性染色法と総称される方法を用いる。酵素タンパク質は特定の生化学反応を触媒する。この性質を利用して、検出しようとする酵素の基質を染色液に加えて、反応の結果できる生成物により、目的の酵素の位置を検出するのがこの方法である。

最もよく用いる方法は、脱水素酵素によるNADまたはNADPの還元反応を利用したものである。酵素反応によって生じた電子がNAD, NADPを通じてPMSへ、さらにそこからNBT, あるいは我々は用いていないがMTT(ともに薄黄色, 可溶性)へと伝達され、その結果フォルマザンと呼ばれる紫色で難溶性の色素が形成され肉眼で認められるようになる。この色素によって酵素活性のある位置を検出できるのである。

NBTを用いた染色では、50mlビーカーに染色液をつくり、これに熱して液体状になった1%アガロースを加える。これをゲルの上にかけて固まらせる染色法(アガロース法)がよく用いられる。この際のアガロースはTakara Agarose LO3が高価であるが、融点が低く作業中に固まりにくいために扱いやすい。

染色液を作る際、気をつけなければならないのはpHの変化である。これはもしpHが酸性側に傾くと失活する基質や酵素を用いているためである。この危険を避けるために緩衝液に基質等を溶かすのであるが、それでも試薬を加える順番を変えないことが大切である。

個々の酵素の染色法の詳細は、「各染色液作製レシピ」の項で後述する。

2-6 ゲルの処理

バンドが現れる時間は酵素種、泳動条件などによりさまざまである。一般にはPGI・PGM・TPIはきわめて活性が強く、30分以内に明瞭なバンドが得られる。これを放置すると、バンドが濃くなりすぎてかえって判別が困難になる。必要なだけ反応が進んだら、5%酢酸に浸して反応を停止させる。その他の酵素は、数時間放置しても問題はない。

染色の終わったゲルは数時間流水で洗う。この時間が不足すると、乾燥保存するゲルが紫色に染まったりする。

ゲルの乾燥保存には、防湿処理をしていないセロハン紙(25×15cm)でゲルを挟み込んで、乾燥用ガラス板に載せて数日間室内に静置して自然乾燥させる。たいていは2、3日でフィルム状のゲルができる。急速に乾燥するとゲルがひび割れることがあるので、セロハン紙の間に10%グリセリンをいれてやるとよい。

なお、特にTPIなどの砒素を含む染色ゲルの処理は実験研究者の義務として各研究室での適切な処理をされたい。

2-7 トラブルシューティング

バンドがうまく発色してくれないのは、試薬酵素あるいは補酵素が失活している場合が多い。また泳動緩衝液が合っていない場合もある。あるいはこれまでの経験から、実験に使う水(蒸留水)に問題がある場合もあるようだ。

ACNが発色しない、あるいは薄い場合は、シスアコニット酸が吸湿して失活している場合がある。この試薬は非常に吸湿しやすいので、保管には十分注意する。

MEとMDHが同一のバンドパターンを示す場合は、NADPが変質してNADとなっていることが考えられる。これを考慮して、NADPは粉末結晶のまま使用することを勧める技術書もある(Murphy et al. 1996)。

PGI、PGMなどの染色で、経費を節約するためにNAD依存性であるG6PDH(シグマ社G5885)を用いることがあるが、ロットによっては全く染まらない場合がある。

染色液にPMSを加えると即座に濃青色に染まる場合があるが、ほとんどの場合ガラス器具の洗浄が不完全なことが原因である。しかしながら、時として試薬自体が発色すべき酵素で汚染されている場合がある。特にG3PDHはロットによってはALDでこのような場合がみられる。またPGIの場合にもよく起こるが、これは基質であるF6Pが、保管の不慎で吸湿したり、あるいは自然反応でG6Pに変質してしまっているために起こる。

3 各染色液作成のレシピ

どの酵素を染めるのか、あるいは用いる試薬の量については予算と相談しながら、各自で最適なやり方を工夫する必要がある。

試薬が溶けると酸性を呈する場合、pHを調整する意味で炭酸ナトリウムを使用するが、緩衝液にTris-HCl(pH 8.5)を使用すればこの必要はなくなる。

ATT Asparate aminotransferase

(EC 2.6.1.1; TEB, #8)

(GOT: Glutamate-oxaloacetate transaminase)

二量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	30 ml
蒸留水	70 ml
DL-アスパラギン酸	200 mg
α-ケトグルタル酸	100 mg
炭酸ナトリウム	300 mg

ゲルに注いでインキュベーターに30分放置

染色液Aを捨てて染色液Bに換える。

B : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	30 ml
蒸留水	70 ml
リン酸ピリドキサール	5 mg
Fast Blue BB Salt	100 mg

注意点:

一連の作業は暗所でおこなう(多少の人工光であれば問題ないとする人もいるので、それほど神経質になる必要はない)。

染色液に浸した後、時々バットを揺すってやること。こうしないと染色むらがやすい。

溶液のpHを最終的に8.0に調節することが、染色をうまくおこなう上で必須であるとの指摘がされている(Soltis et al. 1983)。

筆者の一人である鈴木は、次のような便法を用いて良好な結果を得ている。

1.0M Tris-HCl(pH8.0)	10 ml
蒸留水	90 ml
2-ケトグルタル酸	100 mg
DL-アスパラギン酸	200 mg
炭酸ナトリウム	300 mg
リン酸ピリドキサール	2 mg

100mlコルベンでつくり、アルミ箱でおおう。

染色直前にFast Blue BB salt(光感受性)100mgを染色液にすばやく混ぜて、バット中のゲルにかける。バットにアルミ箱をかけて、37℃で30分間放置。ときどき(10分おき程度)バットをゆらして、染色むらを防ぐ。

ACN Aconitase

(EC 4.2.1.3; TEB, HIST6.0, HIST6.5)

単量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	7 ml
0.1M 塩化マグネシウム	1 ml
cis-アコニット酸	40 mg
炭酸ナトリウム	20 mg
IDH	6 U
NADP	4 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1%アガロース	10 ml

筆者の一人である鈴木は、日常的に以下のようなレシピを用いて、良好な結果を得ている。

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.5)	7 ml
0.1M 塩化マグネシウム	1 ml
cis-アコニット酸	20 mg
IDH	6 U
NADP	4 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1%アガロース	10 ml

ACP Acid Phosphatase (EC 3.1.3.2)

単量体あるいは二量体

A : 0.05M Sodium acetate buffer(pH6.0)	100 ml
(0.66 g の Sodium acetate を 100ml の 蒸留水 に 溶かす)	
暗所, 37℃で30分以上インキュベート	
B : Sodium acetate	0.66 g
α-naphthyl acid phosphate	0.30 g
(1mlのアセトンに溶かす)	
Fast garnet GBC	0.06 g
蒸留水	100 ml

ADH Alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1; TEB)

二量体

1.0M Tris-HCl (pH8.0)	30 ml
蒸留水	70 ml
NAD	10-20 mg
NBT	10-20 mg
PMS	2 mg
エタノール(99%)	2 ml

アガロース法でも可能だが、この場合染色中に基質であるエタノールが揮発して他の酵素を染色中のゲルスライスに影響を及ぼさないように注意する。

ALD Aldolase (EC 4.1.2.13; TEB, #8)

(FBA: Fructose-biphosphate aldolase)

四量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	8 ml
F1,6DP	80 mg
砒酸二ナトリウム	0.1 ml
G3PDH	100 U
NAD	8 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1%アガロース	10 ml

DIA Diaphorase (EC 1.8.1.4; TEB, #8)

(DDH: Dihydropolipoamide dehydrogenase)

単量体あるいは二量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	8 ml
DCIP	4 mg
NADH	10 mg
MTT	5 mg
B : 1%アガロース	10 ml

EST Esterase (non-specific; TEB, #8)

単量体あるいは二量体

A : 0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)	100 ml
Fast Blue RR Salt	100 mg
染色液Aを加えてインキュベーターに10分間放置。 その後、染色液Bをこれに加える。	
B : アセトン	2 ml
α-naphthyl acetate	40 mg
あるいは	
β-naphthyl acetate	40 mg

注意：あまり変異が出ないようであれば、両方の試薬を同時に加える。

FBP Fructose biphosphatase

(EC 3.1.3.11; TEB)

(F1,6DP: Fructose-1,6-diphosphatase)

二量体あるいは四量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	8 ml
0.1M 塩化マグネシウム	2 ml
F1,6DP	30 mg
PGI	15 U
G6PDH	10 U
NADP	8 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1%アガロース	10 ml

GDH Glutamate dehydrogenase

(EC 1.4.1.2; TEB)

四量体?

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	10 ml
L-グルタミン酸ナトリウム	100 mg
NAD	8 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1% Agarose	10 ml

蘚苔類では、倍数体であっても一本のバンドとして現れることが多い。

G3PDH Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(EC 1.2.1.12; TEB, HIST6.5)

(GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

四量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	7 ml
F1,6DP	50 mg
Aldorase	7 U

これらをビーカーに加えて、30分間37℃でインキュベーター。その後下記のものを加える。

硫酸二ナトリウム	0.1 ml
NADP	8 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1% Agarose	10 ml

G6PDH Glucose-6-phosphate dehydrogenase

(EC 1.1.1.49)

二量体?

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	8 ml
G6P(disodium salt)	10 mg
EDTA	10 mg
NADP	4 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1% Agarose	10 ml

HEX Hexokinase (EC 2.7.1.1; #8)

単量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	7 ml
0.1M 塩化マグネシウム	1 ml
D(+)-グルコース	20 mg
EDTA	10 mg
G6PDH	10 U
ATP	10 mg
NADP	4 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1% Agarose	10 ml

IDH Isocitrate dehydrogenase

(EC 1.1.1.42; TEB, HIST6.0, HIST6.5)

二量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	7 ml
0.1M 塩化マグネシウム	1 ml
イソクエン酸ナトリウム	40 mg
NADP	4 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1% アガロース	10 ml

LAP Leucine aminopeptidase

(EC 3.4.-.-; TEB, #8)

(CAP: Cytosol Aminopeptidase / Pep-E Peptidase-E)

単量体

A : ジメチルホルムアミド	1 mlに
L-leucine- β -naphthylamide HCl	50-100 mgを
十分に溶かして、これに	
0.2M リン酸緩衝液(pH6.0)	100 ml
0.1M MgCl ₂	2 ml
を加える。	

染色液Aで37℃で30分間。染色液Aを捨てて、染色液Bに交換する。

B : 0.2Mリン酸緩衝液(pH6.0)	100 ml
Black K salt	100 mg
(あるいはFast garnet GBC)	80 mg)

●ゲルに注ぐ前に、A染色液を電子レンジで30秒ほど温めてやると活性が良くなることがある。

●B染色液を染色の直前に調製することが肝要である。

●2, 3時間で染まるはずだが、染まり方が悪いときは、インキュベーターで、少なくとも8時間は放置する。

●バックグラウンドのオレンジ色は、ゲルスライスのアセトンで洗うと容易に落ちる。

MDH Malate dehydrogenase
(EC 1.1.1.37; HIST6.0, HIST6.5)

二量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	7 ml
2.0M DL-リンゴ酸(pH 8.0)	2 ml
EDTA	10 mg
NAD	8 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1 % Agarose	10 ml

●Murphy et al.(1996)によればEDTAは必須ではない。

ME Malic enzyme (TEB, HIST6.5)

四量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	7 ml
0.1M 塩化マグネシウム	1 ml
2.0M DL-リンゴ酸(pH8.0)	2 ml
NADP	4 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1 % Agarose	10 ml

●Murphy et al.(1966)には次のような注意が書かれている; "It is important that NADP be used in solid form in this stain. There is often sufficient break down of NADP to NAD in liquid stocks in prolonged storage that NAD-dependent MDH activity will be resolved in addition to ME."

しかしながら我々が実験している限りでは、蒸留水に溶かして保管していても数ヶ月は大丈夫のようである。

PER Peroxidase (EC 1.11.1.7; TEB)

サブユニット構造は不明

A : 3-amino-9-ethylcarbazole	0.44 g
N,N-dimethylformamide	2 ml
これに以下のものを加える。	
B : 0.05M sodium acetate buffer(pH5.0)	5 ml
0.1M CaCl ₂	1 ml
3 % hydrogen peroxide	1 ml

これをゲルにかけ、冷蔵庫で30-60分染める。

●N,N-dimethylformamideは強い発ガン性が報告されているので、取扱には十分に注意する。

PGI Phosphoglucose isomerase

(EC 5.3.1.9; TEB, #8)

(GPI: Glucose-6-phosphate Isomerase)

二量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	8 ml
0.1M 塩化マグネシウム	1 ml
F6P	10 mg
G6PDH	10 U
NADP	4 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1 % Agarose	10 ml

F6Pのロットによってはあらかじめ染色液を作っておくと、PMSを入れた段階で青く変色する場合がありますので、そのときは染める直前に調製する。

PMI Phosphomannose isomerase

(EC 5.3.1.8; #8, TEB)

(MPI: Mannose phosphate isomerase)

単量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	8 ml
0.1M 塩化マグネシウム	1 ml
M6P	10 mg
G6PDH	10 U
PGI	10 U
NADP	4 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1 % アガロース	10 ml

PGM Phosphoglucomutase

(EC 5.4.2.2; TEB, HIST6.5)

単量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	7 ml
0.1M 塩化マグネシウム	1 ml
G1P(Sigma G1259)	10 mg
G6PDH	10 U
NADP	4 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1 % アガロース	10 ml

この酵素は、非常に染まりやすくまたバンドが濃く出る。反面、放っておくとバンドが濃く染まりすぎ判別不能になるので、注意して観察し、適当なところで反応を止める必要がある。

6PG 6-phosphogluconate dehydrogenase

(EC 1.1.1.44; HIST6.5)

(PGDH: Phosphogluconate dehydrogenase)

二量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	6 ml
0.1M 塩化マグネシウム	3 ml
6-phosphogluconic acid	20 mg
炭酸ナトリウム	20 mg
NADP	4 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1%アガロース	10 ml

SOD Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1; TEB)

二量体あるいは四量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH9.0)	10 ml
0.1M MgCl ₂	1 ml
NAD	8 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1%アガロース	10 ml

試薬の溶けたアガロースをかけた後、十分に光を浴びせる。SODの働きで、その部分だけがNBT→フォルマザン反応が起こらず、青いバックグラウンドに白くぬけたバンドとして現れる。ただし、ゲル自体の白濁した色が抜けて透明になって見えるのは、アミラーゼが検出されたものであり、SODではない。

泳動・ゲル用緩衝液としてTEBを用いた場合、MEやGDHを染色する際に付随バンドとして検出することができる。

SKDH SIKimate dehydrogenase

(EC 1.1.1.25; TEB)

サブユニット構造は不明

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	7 ml
シキミ酸	30 mg
炭酸ナトリウム	30 mg
NADP	4 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1%アガロース	10 ml

TPI Triosephosphate isomerase

(EC 5.3.1.1; TEB)

二量体

A : 0.2M Tris-HCl(pH8.0)	8 ml
Dihydroxyaceton phosphate	2 mg
硫酸二ナトリウム	0.5 ml
EDTA	10 mg
G3PDH	100 U
NAD	8 mg
NBT	4 mg
PMS	1 mg
B : 1%アガロース	10 ml

4 泳動用・ゲル用緩衝液とその泳動条件

●ここにあげた緩衝液以外に、実に多くのシステムがこれまで発表されている。詳細についてSoltis et al. (1983)やMurphy et. al (1996)などを参照されたい。

●基本的にはここに示された薬品の量を守ること、指定されたpHになる。

●いずれの場合でも、毎回作るの面倒なので、5リットルないし10リットル作ってストックしておくとうりである。数ヶ月で使用するならば、冷蔵する必要はない。

●わずかのpHの違いも、泳動の結果得られるバンドの分離には大きな影響を及ぼす。pHメーターは常に整備しておくことに注意する。

High pH system

Tris-Borate-EDTA, pH8.6(略号 ; TEB or #10)

泳動用緩衝液

Tris	21.6 g
EDTA 3Na	1.82 g
ホウ酸	7.7 g

蒸留水に溶かして、全量を1リットルにする。

塩酸を用いて、pH8.6に合わせる。

ゲル用緩衝液

泳動緩衝液を1 : 3に薄めて用いる。

泳動条件

定電流80mAで5時間

Soltis #8 modified (#8)

泳動用緩衝液

LiOH	1.64 g
ホウ酸	16.23 g

蒸留水に溶かして、全量を1リットルにする。

水酸化ナトリウムを用いて、pH8.0に合わせる

ゲル用緩衝液

Tris	4.00 g
クエン酸(無水)	1.05 g
LiOH	17 g
ホウ酸	1.85 g

蒸留水に溶かして、全量を500mlにする。

塩酸を用いて、pH7.5に合わせる。

泳動条件

定電流60mAで5時間

●泳動中にゲルが著しく縮む。

Tris-Borate-EDTA modified pH 8.0

泳動用緩衝液

Tris	60.60 g
EDTA, 4Na salt	7.23 g
ホウ酸	35.30 g

塩酸を用いて、pH8.0に合わせる。

ゲル用緩衝液

泳動緩衝液を1:9に希釈する。

泳動条件

定電流50mAで約12時間

●蕨類ではよい結果が期待できる。

Low pH system

Histidine-citrate, pH 6.5 (#9)

泳動用緩衝液

L-ヒスチジンfree base	10.0 g
クエン酸(無水)	2.8 g

これらを蒸留水に溶かし、全量を1リットルにする。

必要ならば、NaOHを用いてpHを合わせる。

ゲル用緩衝液

泳動緩衝液を1:3に薄めて用いる。

泳動条件

定電流60mAで5時間、あるいは定電圧300Vで5時間

Histidine-citrate, pH 6.0(#9 modified)

泳動用緩衝液

L-ヒスチジンfree base	10.0 g
クエン酸(無水)	6.5 g

これらを蒸留水にとかし、全量を1リットルにする。

必要ならば、NaOHを用いてpHを合わせる。

ゲル用緩衝液

泳動緩衝液を1:3に薄めて用いる。

泳動条件

定電流50mAで5時間

5 たくさんの酵素種をうまく発色させるには？

対象となる植物種によって、染まる酵素の種類、適した緩衝液システム、あるいはバンドの現れ方が異なる。あらかじめ予備実験をして確かめておく必要がある。この手順を省くと、多くの酵素種で満足のゆく結果を得ることが難しくなり、結果として時間が余計にかかったり、あるいは十分な結果を得ることができなくなったりする。

また、すりつぶし緩衝液がもっとも大きな影響を与えるのではとの指摘もある。うまくゆかないときは、「2-1すりつぶし」の項を参考にして、まずすりつぶし緩衝液を工夫してみることが肝心であろう。

以下には、著者らが日常的に染色している酵素とそれに適した緩衝液システムを列挙する。要は、すくない泳動回数で最大の効果を得ることが大切であり、そのための工夫である。あくまで参考程度にとどめてほしい。

T E B (秋山)AAT, ADH, ALD, GDH, ME, LAP, G3PDH, PGI, PGM, SOD, TPI

(鈴木)ADH, ACN, FBP, IDH, PGM, SKDH

8 (鈴木)AAT, LAP, HEK, PGI, PGM, TPI

Hist(pH6.0)(秋山)MDH, IDH, ME

Hist(pH6.5)(秋山)GDH, SKDH, ACN, 6PG, PGM

(鈴木)ACN, G3PDH, IDH, MDH, ME, PGM, 6PG, SKDH

6 薬品・試薬酵素一覧

どこの会社の製品が良い結果をもたらすかについては、よくわからないことが多い。それよりも、ロットの当たり外れのほうが影響が大きいと思われる。

以下に我々が日常的に購入・使用している試薬と製造会社名を列挙する。

シグマ社

水解デンプン(Starch, potato) S4501 2 kg

(ナカライ薬品の水解デンプンは、シグマ社のものと同じものであり、かつ値段がシグマ社製の60%程度と安いので、こちらを用いるとよい。著者らの経験では、日本の他社の製品は使用に耐えない)

Fast Blue RR salt F0500 25 g

Fast Blue BB salt F0250 25 g

Fast Black K salt F7253 25 g

Bromophenol blue, sulfone form B0126 25 g

DCIP (2,6-dichlorophenol indophenol)

D1878 50 g

PVP-40T (Polyvinyl pyrrolidone) F-0095 100 g

PMS(Phenazine methosulfate) P9265 1 g

IDH (Isocitric dehydrogenase) I2002 25 mg

F16DP (D-fructose-1,6-diphosphate)	752-1	1 g
G3PDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	9263	1000 U
F6P (D-fructose-6-phosphate)	F3627	1 g
Dihydroxyacetone phosphate	D7137	100 mg
M6P (D-mannose-6-phosphate)	M8785	1 g
6PG (6-phosphogluconic acid)	P7627	500 mg
G1P (α -D-glucose-1-phosphate)	G1259	1 g
G6P (Glucose-6-phosphate)	G7250	1 g
(-)-Sikimic acid	S5375	5 g
ATP (Adenosine-5'-triphosphate)	A5394	1 g
Aldolase (硫酸ソリューション)	A1893	200 U
α -naphthyl acetate	N8505	25 g
β -naphthyl acetate	N6875	25 g

オリエンタル酵母

G6PDH (Glucose-6-phosphate dehydrogenase)	1000 U
必ずイースト由来のものを購入すること	
β -NAD	1 g
β -NADP	1 g
β -NADH	1 g

Takara

アガロース(LO-3)	100 g
-------------	-------

和光

L-leucyl- β -naphthylamide hydrochloride	1 g
NBT (Nitro blue tetrazorium)	1 g
DL-イソクエン酸ナトリウム	1 g
砒酸二ナトリウム	25 g
リン酸ピリドキサール 1 水和物	1 g
グルコース	25 g
グルタミン酸ナトリウム	25 g
トリス	1 kg
DL-リンゴ酸	500 g
クエン酸(無水)	500 g
ホウ酸	500 g
塩化マグネシウム 6 水和物	500 g
炭酸ナトリウム	500 g
グリセリン	500 ml
L-ヒスチジン free base	500 g
石英砂	500 g

ナカライ

DL-アスパラギン酸	25 g
α -ケトグルタル酸	25 g
cis-アコニット酸	1 g

7 実験に用いる緩衝液, 試薬の調整

ここでは, 日常的に用いる緩衝液等の作り方を列挙する. 筆者達のように化学に疎い人もいであろうことを考慮して, 簡単なものについても記した.

●0.2M Tris-HCl 緩衝液(pH8.0) — 各種染色液に使用.
1.0Mのストック溶液をつくり, 使用時に 5 倍希釈.

1.0Mのストック溶液は約900mlの蒸留水にトリス(正式にはトリス(ヒドロキシメチル)アミン)121.1gを溶かし, 塩酸でpH8.0に滴定する(市販の30%塩酸原液で行える). その後, 蒸留水を加えて1000mlにする.

●0.2M Tris-HCl 緩衝液(pH8.5) — 各種染色液に使用.
上記pH8.0と同様にして作製する.

酵素反応の基質等が溶かした状態で強い酸性を示す場合, 炭酸ナトリウムを加えるが, 緩衝液としてこれを用いると加える必要がなくなり便利である.

●0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0) — LAP染色液に使用.

0.5Mのストック溶液をつくり, 使用時に 5 倍希釈.

0.5Mのストック溶液をつくるには, まず0.5Mリン酸 2 水素ナトリウム溶液500ml(リン酸 2 水素ナトリウム 1 水和物39.0gを蒸留水約400mlに溶かして, 蒸留水を加えて500mlにする)と0.5Mリン酸水素 2 ナトリウム溶液500ml(リン酸水素 2 ナトリウム12水和物89.5gを蒸留水約400mlに溶かして, 蒸留水を加えて500mlにする)をつくる. 溶けにくい場合にはホットスターラーなどで温めると容易に溶ける. 次に0.5Mリン酸 2 水素ナトリウム溶液500mlを0.5Mリン酸水素 2 ナトリウム溶液でpH6.0に滴定する.

●1.0M塩化マグネシウム溶液 — Mg^{2+} 依存性酵素の染色に使用.

塩化マグネシウム 6 水和物 6.06gを蒸留水で30mlにして溶かす.

塩化マグネシウムは吸湿性が強く, 試薬びんはデシケーターで保存する.

●1.0M砒酸二ナトリウム溶液 — G3PDH染色またはG3PDHを用いる染色(例えば後述のTPI, ALD)に使用.

砒酸二ナトリウム 7 水和物3.12gを蒸留水で10mlにして溶かす.

毒物であるので, 保管は厳重に注意すること.

●G6PDH, G3PDH, Aldolase

パウダーになっているものは, 50%グリセリン溶液に溶かして冷凍保存. 溶液100 μ lあるいは200 μ lで必要なユニット数の酵素をはかりとれるようにしておくこと便利.(著者らは, Aldolaseについては硫酸アニモニウム沈澱になったもの(Sigma A1893)が, 値段が安いので使っている)

●F1,6DP

1gを50%グリセリン溶液に溶かし, 0.5ml中に

80mgが含まれるように調製する。

●NAD, NADP

ともに1g瓶を購入し、蒸留水50mlに全量をとかず(一度にどれだけの量をつくるか、あるいはどれだけの濃度にするかは適当でよいが、筆者らは200 μ lに4mg含まれているようにしている)。

冷暗所で保管するが、数ヶ月以上経つとカビが生じることがあるので、しばらく実験をしない場合や少量しか必要としない場合は、作りおきしないようにする。

酵素の発色がうまくゆかない場合、NADPあるいはNADが失活している可能性がある。この原因としては、溶かした蒸留水のpHがどちらかに傾いていることも考えられる。疑わしい場合は、0.2M Tris-HCl緩衝液に溶かすと良い。ただしこの場合は、長期の保存には向かない。多少でもオレンジ色を呈するようになったら使用不能。

●NBT

10mg/mlとなるように蒸留水に溶かす。光感受性があるので、褐色びんまたはアルミ箔でおおって保存する。塩化マグネシウムが混入すると沈澱をつくってしまうので注意。

●PMS

2mg/mlとなるように蒸留水に溶かす。光感受性があるので、褐色びんまたはアルミ箔でおおって保存する。

●2Mリンゴ酸(pH8.0) — MDH, MEの染色

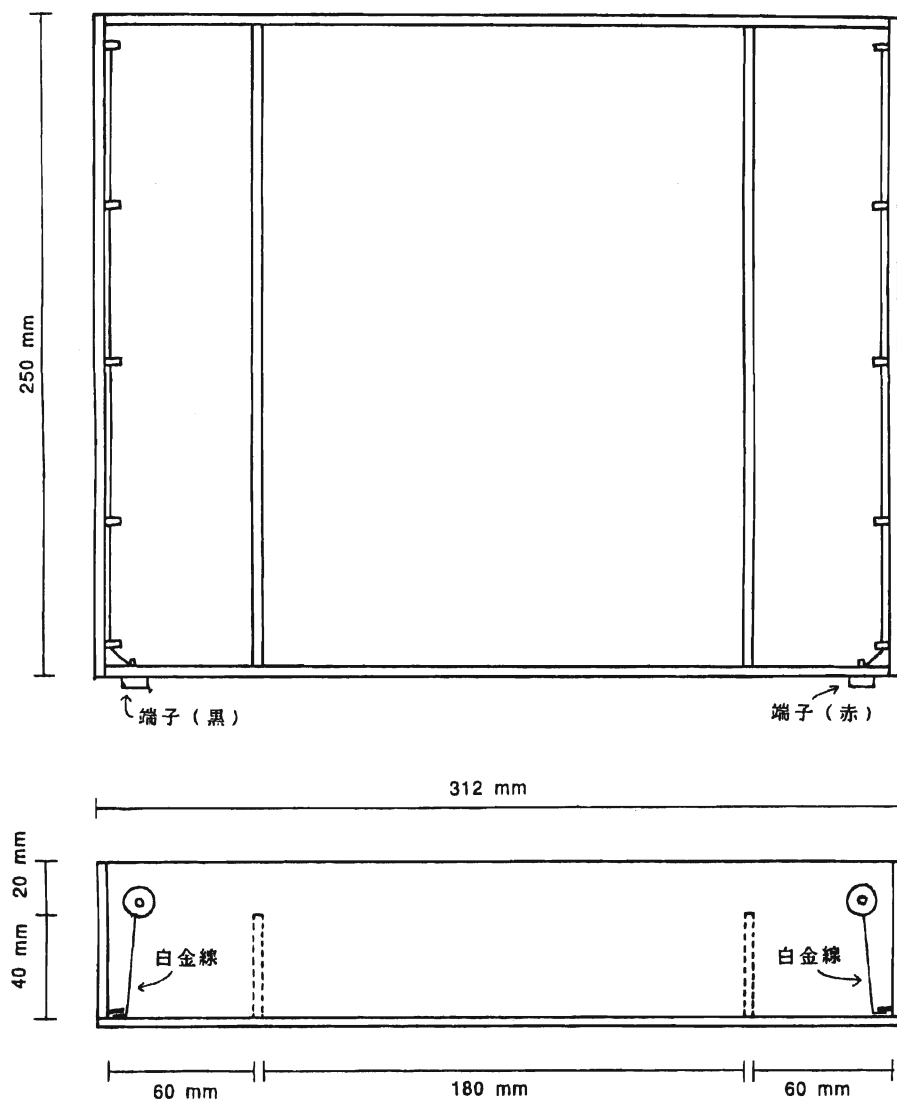
DL-リンゴ酸134.1gを蒸留水約300mlに溶かす。固形の水酸化ナトリウムを加えてpH8.0にしてから、蒸留水で500mlにする。

●1 規定水酸化ナトリウムは、蒸留水100mlに水酸化ナトリウム4gを溶かしてつくる。

●1 規定塩酸は、30%塩酸(原液)を10倍に希釈する。

8 引用文献および参考となる文献

- 秋山弘之(1991)デンプンゲル電気泳動法 自然環境科学研究, 4号, 105-116.
- Boisseler-Dubayle M.C., Lambourdere J. and Bishler H. (1996) Progeny analysis by isozyme markers in the polyploid liverwort *Plagiochasma rupestre*. *Can. J. Bot.*, **74**, 521-527. [かけあわせをして得られた子孫について対立遺伝子の挙動を調べた論文]
- Cronberg, N. (1995) Isozyme electrophoresis of *Sphagnum*: an analysis of methodology. *Lindbergia*, **20**, 40-48. [他の蘚苔類と異なり、抽出緩衝液や泳動緩衝液の選択においてミズゴケでは独特の注意が必要であるが、それらの事柄について経験に基づいて詳述されている]
- Harris, H.G. and Hopkinson D. A. (1976) *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. North Holland Publishing Co. [発色の原理やサブユニット構造を調べるのに便利]
- Krazakowa, M. (1996) Review of genetic investigations on bryophytes in Poland. *Cryptogamie, Bryol. Lichenol.*, **17**, 237-243. [ポーランド研究者たちによるアイソザイムを用いた蘚苔類の研究例のすべてが引用されている]
- Murphy, R.W., Sites J.W. Jr, Buth D.G. and Haufler C. H. (1996) Protein: Isozyme electrophoresis. In D.M. Hills, C. Moritz & B.K. Mable (eds.): *Molecular systematics, 2nd ed.* Sinauer Associate Inc., Massachusetts, 51-120. [実験の手順が写真入りで解説されているだけでなく、2倍体で得られたザイモグラムをどのように対立遺伝子に読み替えるのかについて述べられた部分が特に参考になる]
- 根井正利(1990)分子進化遺伝学 培風館, 東京, 443p. [分子的手法を用いる人は必読の教科書。とりわけ解析法について詳しく解説されている]
- Richardson, B.J., Baverstock P.R. and Adams M. (1986) *Allozyme electrophoresis*. pp.410. Academic Press. [おもに動物を対象とし、アセテート膜を使った電気泳動法について詳述されている]
- Soltis, D.E., Haufler C.H., Darrow D.C. and Gastony G.J. (1983) Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Amer. Fern J.*, **73**, 9-27. [様々な緩衝液システムや染色法についてかかれた論文]
- Soltis, D.E. and Soltis P.S. (eds.) (1989) *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press, Oregon. [アイソザイムについての基本的な教科書]
- Stoneburner, A., Wyatt R. and Odrzykoski I.J. (1991) Application of enzyme electrophoresis to bryophyte systematics and population biology. *Advances in Bryology*, **4**, 1-27. (1998年6月5日受付) (1998年7月29日受理)



板はすべて 3 mm 厚の亚克力板

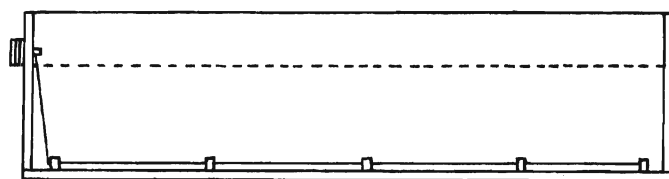


図1 泳動槽(上面, 正面, 側面)

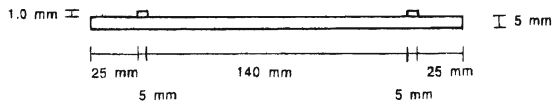
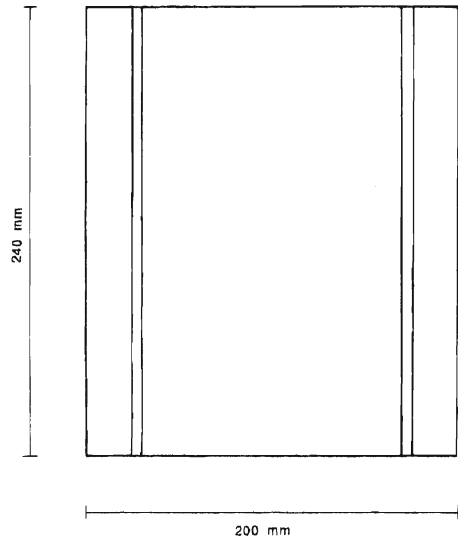


図 2

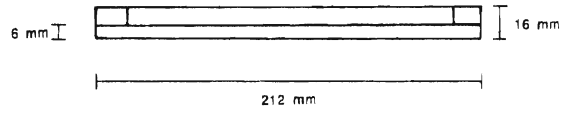
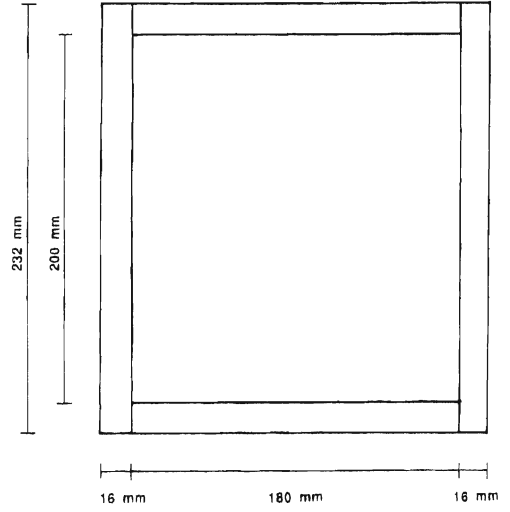


図 3

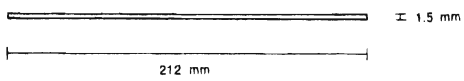
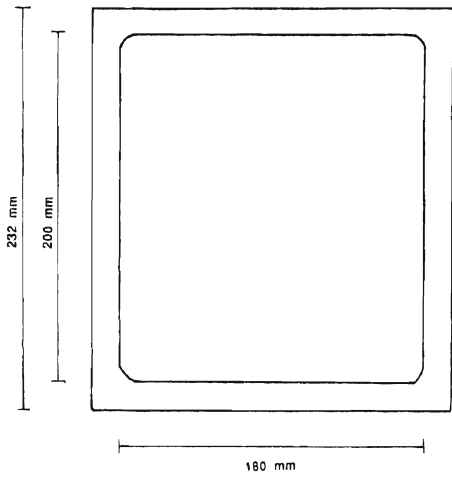


図 4

図 2 ゲルを切るときに用いる板

図 3 ゲルをつくるときに用いる枠板

図 4 ゲルをつくるときに用いるかさ上げ用の枠板

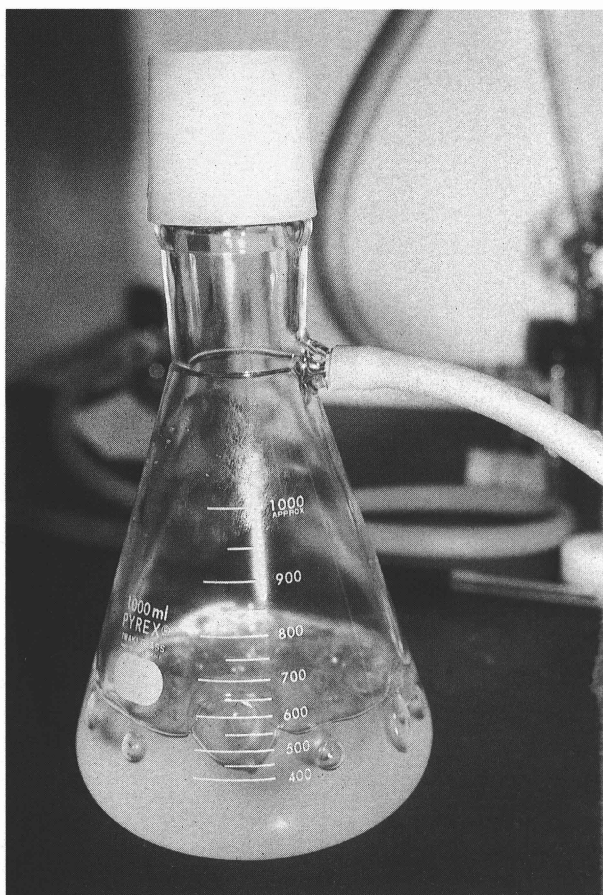


写真1 溶かしたデンブンを、細かい泡がでなくなるまでアスピレーターを用いて十分に脱気する。

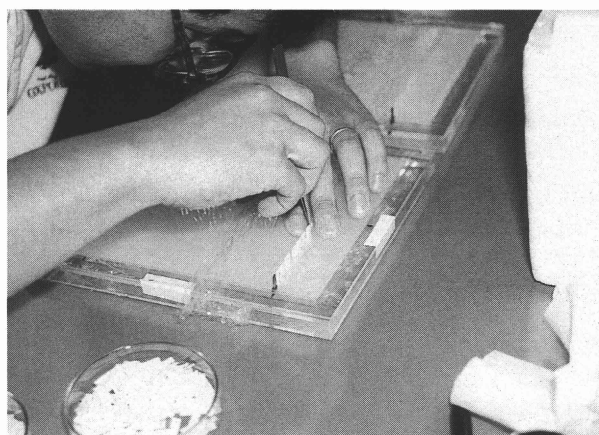


写真2 固まったゲルに、下から3cmのところ切り目を入れ、そこにすりつぶし液を染み込ませた濾紙片をはさみこんでゆく。両端にはマーカーを染み込ませた濾紙片をいれる。切れ込みを入れたゲルが密着するように、ゲルと枠との間に、適当な大きさの薄い板をはめ込む(アイスクリームの棒が使いやすい)



写真3 冷蔵庫中で泳動する。泳動開始後20分ほどで、ウィックを抜き取る。泳動の様子はマーカーの流れ具合で判断する。

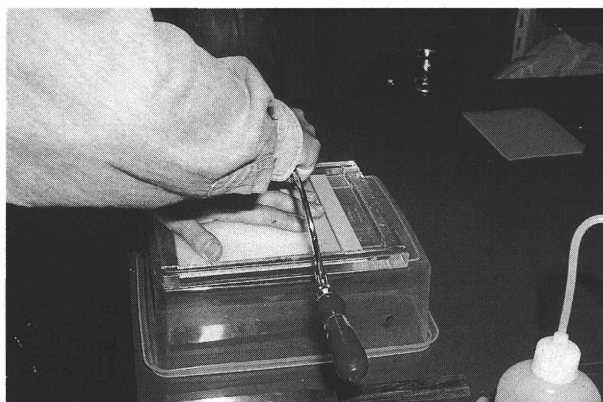


写真4 泳動の終了したゲルを取り出して薄く切る。ゲルを薄く切る道具として、糸鋸用の台にギター用の弦を張ったものを自作する。このとき、表側がわかるように、右上を切り落としておく。切ったゲルはガラス板の上に乗せて、ガラス板の右上に染色する酵素の名前を書いたビニールテープを貼っておく。一番はじめのゲルは染色に用いないこと。



写真5 染色液に1%アガロース10ml(手に持っている容器に入っている)を加え、数回ピーカーを振ってよくかき混ぜた後に、ゲルの上に流し落とす。すぐ固まり始めるので手早く作業を行う。染色後は37度から38度に設定された遮光した保温器に入れ、発色を促す。

