

# パーオキシダーゼアイソザイムの検出方法の検討

## —(1)デンブengel電気泳動法による検出—

九州林木育種場 西村 慶二  
 〃 金光 隆義  
 林試九州支場 白石 進

### はじめに

アイソザイムの検出精度に関係する技術的な要因としては、1) 試料の採取時期とその保存、2) 粗試料の抽出方法、3) デンブengelの品質、4) 泳動電圧、5) 緩衝液の違い、6) 染色液の違い等が考えられる。

1) については従来から多くの人々によって実験され、その技術はほぼ定着しているものと思つてよい。

2) については従来から使用していた乳鉢によるのがすぐれているが、試料点数が多くなると作業能率が悪くなる。3) については保存中に変質する恐れがあるため、一度に多量の購入が出来ず、購入時期の違いによる品質の違いがザイモグラム不安定要因となっている。<sup>1)5)</sup>、6) についてはいくつかの方法が開発されている。<sup>2)</sup>。そこで、今回は2)、5)、6)と抽出した粗試料保存について、スギのパーオキシダーゼアイソザイム検出の実験を行った。

### 材料及び方法

実験計画は表-1のとおりである。

#### 実験Ⅰ

##### 1) 粗試料の抽出方法

乳鉢と植物組織分析用試料の迅速摩砕装置<sup>3)</sup>(以下摩砕装置と呼ぶ)を用い、スギ針葉 0.3g に水 0.8cc を加え、それぞれの手法ですりつぶし粗試料とした。

##### 2) 緩衝液

緩衝液は連続系と不連続系に大別されるが、今回の実験は各1種類ずつを用いた(表-2)。

##### 3) 染色液

パーオキシダーゼの染色には従来ベンジジン、酢酸ベンジジンまたは、オルトジアニジンなどが使用されていたが、これらはいずれも発癌性物質であるということから、その生産が中止されているので、3-アミノ-9-エチルカルバゾールと5-アミノ-2-ナフトールを使用した。

#### 実験Ⅱ

##### 粗抽出試料の保存

保存期間の違いによる影響は、8日、6日、4日前からそれぞれ保存したものと、当日ですりつぶしたものを同時に泳動し、酵素活性をみた。粗試料の保存は、

摩砕装置を用いてすりつぶし、吸取紙に吸着させたものをスライドグラスの上のせ、内径17mmの試験管に入れて、5℃の保冷庫の中で行った。

実験Ⅰ、Ⅱに用いたゲル容器は、水平巾広型で、初期泳動電圧は100v10分間、本泳動は250vとした。マーカーの移動距離はゲル容器の中心線で160mmとした。

### 結果及び考察

乳鉢と摩砕装置の作業能率を比較すると、中川原ら<sup>4)</sup>が指摘しているとおり、1試料 0.3g をすりつぶすのに乳鉢においては通常10~15分必要とするが、摩砕装置では、摩砕棒の着脱等に要する時間を加えても2~3分である。

抽出方法別のザイモグラムを見ると、乳鉢ですりつぶした方が摩砕装置のそれよりマイナス側バンドの分離がよかった。しかし、乳鉢ですりつぶした場合、実験者のちがいで検出バンドに差が見られることがあるが、摩砕装置の場合は短時間に習熟でき、しかも、均質な試料を得ることが出来る。

緩衝液の違いによるアイソザイムの分離は、連続系に比べ不連続系の方が良く、またアイソザイムバンドの中も狭いことから、観察が容易である。

染色液の違いについては、連続系緩衝液の場合、5-アミノ-2-ナフトールに比べて3-アミノ-9-エチルカルバゾールの方が判定しやすかったのに対して、不連続系緩衝液の場合には両者に差が見られなかった。

以上のことから、スギ針葉のパーオキシダーゼ酵素の検出には、粗試料を摩砕装置ですりつぶし、不連続系緩衝液で泳動を行い、3-アミノ-9-エチルカルバゾールで染色する方法が最も良いと思われる。

酵素の安定性はその種類によって差があると言われている<sup>5)</sup>ので、粗試料の保存期間は、検出しようとする酵素によって異なるものと思われる。パーオキシダーゼの場合には、酵素安定剤を粗試料の中に加えなくても、摩砕後4日ぐらゐは酵素活性に変化がないことが判った。このことから、試料点数が多い場合には、毎日抽出を行うのは能率的でないので、4日分ぐらゐを前もって抽出しておく、泳動する日の作業量が少なくなる。

表-1 実験計画法

実験Ⅰ								
ゲル容器No.	緩衝液		染色液	摩砕装置	乳 鉢	備 考		
1	連続系		A.E.C	A B C	A B C			
2	〃		5 A 2 N	〃	〃			
3	不連続系		A.E.C	〃	〃			
4	〃		5 A 2 N	〃	〃			
実験Ⅱ								
ゲル容器No.	カ ワ シ マ ス ギ				県 肝 属 1 号			
1	8 日前	4 日前	2 日前	当日	8 日前	4 日前	2 日前	当日

- 註) 1. A. E. Cは3-アミノ-9-エチルカルバゾール  
 2. 5 A 2 Nは5-アミノ-2-ナフトール  
 3. Aはカワシマスギ  
 4. Bは県肝属1号  
 5. Cは県阿蘇8号  
 6. 実験Ⅱは不連続系緩衝液で泳動を行い, A. E. Cで染色を行った。

表-2 デンプンゲル用ザイモグラフィーに使用した緩衝液系

種 別	ゲル用緩衝液	電極用緩衝液	備 考
連続系 <sup>6)</sup>	ホ ウ 酸 1.80g カ性ソーダ 0.21g 水 1ℓ	ホ ウ 酸 18.5g カ性ソーダ 3.4g 水 1ℓ	Schwartz (1960)
不連続系 <sup>7)</sup>	ト リ ス 5.53g クエン 酸 1.44g 水酸化リチウム0.12g ホ ウ 酸 1.13g 水 1ℓ	ホ ウ 酸 11.8g 水酸化リチウム 1.2g 水 1ℓ	Ashton (1961)

文献 (1)九州林木育種場:昭和53年度九州地区  
育種連絡協議会資料  
 (2)最新電気泳動法, PP. 671, 廣川書店  
東京, 1978  
 (3, 4)育種学雑誌, PP. 178, 日本育種学会  
東京, 1976

(5)井田正二, タンパク質核酸酵素, 187  
~ 195, No. 2, 1976  
 (6)科学レポート, PP. 6, 東洋科学産業  
株式会社, 東京, 1968  
 (7)遠藤 徹, S A B C O, Joarnal , 2  
-3.4, 50~56, 1966