

# SOD 活性の微量電気泳動法的解析法

萩 田 善 一  
堀 越 葉 子  
(富山医科薬科大学和漢薬  
研究所・病態生化学部門)

活性酸素が白血球などの殺菌作用，脂質の酸化，放射線障害，炎症，免疫，発癌，制癌，白内障，動脈硬化，肝臓疾患などに深い関係をもつことが明らかにされてきた。また，染色体切断などの生命現象にも重要な役割をはたしていることから，活性酸素を不活化する酵素である SOD (Superoxide dismutase) の研究が盛んに行われている。これに伴って SOD の定量，定性のための多くの方法が検討されている。本研究は毛根や，生検などで得られる微量肝臓組織を試料として用いた微量電気泳動法による解析法を確立することにある。

## 研究 方 法

萩田ら<sup>1)</sup>によるポリアクリルアミドを支持媒質とした水平式，垂直式および等電点電気泳動法により，微量試料に適した SOD 検出法の電気泳動条件について検討した。

a) 試料調整法…試料としてマウスおよびラット肝臓組織および培養細胞を用いた。肝臓組織は脱イオン水でホモジネートし，5% (w/v) に希釈する。培養細胞は超音波による破碎と凍結融解を組合せることによって試料から抽出溶液を作った後，脱イオン水で  $5 \times 10^7$  コ/ml の濃度になるように調整した。これらの磨砕液を  $13,000 \times g$  で30分間遠心し，上澄液を試料溶液として用いた。垂直式電気泳動法では試料溶液中の蛋白質成分が緩衝液中へ拡散することによって希釈することを防ぐため，これらの試料溶液にさらに等量の試料希釈溶液 (BTB, 20%グリセリン) を加えた。

b) 泳動条件は表1の(1)~(3)に示した。

c) SOD 活性染色法…泳動終了後，ゲルを染色用(1)液に10分間浸した後，(2)液に浸して蛍光灯下におく。15~40分で青く染色された背景に，SOD 活性部が白く抜けた活性泳動帯として分離検出される (表1-(4)参照)。

## 結 果

上記の泳動条件によりマウス，ラットの Cu, Zn 型 SOD, ヒトの Cu, Zn 型 SOD および Mn 型 SOD の両者を鮮明な泳動分離像として得ることができた。

表 1

(1) Vertical polyacrylamide gel electrophoresis	
Buffer system	
1. Running-gel buffer	188 mM, Tris-HCl buffer, pH 8.8
2. Spacer-gel buffer	30 mM, Tris-HCl buffer, pH 6.8
3. Electrode buffer	125 mM, Tris-Glycine buffer, pH 8.3
4. Sample diluting soln.	125 mM, Tris-HCl buffer, pH 6.8
Concentration of running gel : 8.0%	
Concentration of spacer gel : 4.0%	
Electrophoresis : constant current of 1 mA/cm for 2 hours	
(2) Horizontal polyacrylamide gel electrophoresis	
Buffer system	
1. Gel buffer	188 mM, Tris-HCl buffer, pH 8.8
2. Electrode buffer	50 mM, Borate-NaOH buffer, pH 8.2
Concentration of gel : 5.0%	
Electrophoresis : constant current of 1 mA/cm for 2.5 hours	
(3) Isoelectric focusing electrophoresis	
pH range 3.5-10.0	
Electrode solutions : anode 1.0M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	
cathode 1.0M NaOH	
Concentration of gel : 3.0%	
Electrophoresis :	
pre running.....constant current at 0.5 mA/cm for 0.5 hours and	
constant voltage at 68 V/cm for 1.5 hours	
running.....constant voltage at 68 V/cm for 3.0 hours	
(4) Reagents for SOD staining	
Solution 1.	
50 mM, phosphate buffer, pH 7.8	15ml
Nitro Blue Tetrazolium solution (4 mg/ml)	5ml
Solution 2.	
50 mM, phosphate buffer, pH 7.8	49ml
Riboflavin (0.1 mg/ml)	1ml
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	0.16ml

## 考 察

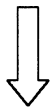
微量試料を用いて酵素活性を解析するためには、いかにして試料溶液を得るかという点が重要である。その意味では、超音波による細胞の破碎と凍結融解を組合せることによってこの問題は解決できた。

この方法により、毛根あるいは肝臓の生検より抽出液を得ることも可能となった。また濾紙片に試料をのせ、圧力を加えて細胞内容液を圧出・吸収させて、これを電気泳動法の試料として用いる方法も今後さらに検討したい。



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



活性酸素が白血球などの殺菌作用,脂質の酸化,放射線障害,炎症,免疫,発癌,制癌,白内障,動脈硬化,肝臓疾患などに深い関係をもつことが明らかにされてきた。また,染色体切断などの生命現象にも重要な役割をはたしていることから,活性酸素を不活化する酵素であるSOD(Superoxide dismutase)の研究が盛んに行われている。これに伴ってSODの定量,定性のための多くの方法が検討されている。本研究は毛根や,生検などで得られる微量肝臓組織を試料として用いた微量電気泳動法による解析法を確立することにある。