

(5) 電気泳動による還元型及び酸化型アルブミンの評価法の検討

川崎医療福祉大学医療技術学部臨床栄養学科 ○中村 博範, 三宅 沙知

【背景】 アルブミン (ALB, 66kDa) は, その分子内にシステインに由来する遊離 SH 基が1つある. 血中では, 遊離 SH 基を保持した還元型 ALB と遊離 SH 基にシステインなどが結合した酸化型 ALB として存在する. この2つの比率は, 生体内の酸化還元状態を反映するとされ, 近年, 酸化ストレスマーカーとして注目されている. しかし, その測定には, 高速液体クロマトグラフなどの高価な分析装置を必要とするため, 簡易に測定できないのが現状である. そこで, 私たちは, 簡易な方法として電気泳動装置での還元型 ALB と酸化型 ALB の評価法を開発することにした.

【目的】 還元型 ALB と酸化型 ALB の比率を評価するためには, まず, この2つの ALB を分離する必要がある. そこで, たんぱく質の遊離 SH 基をポリエチレングリコールマレイミド (PEG-mal) で修飾する PEGylation (PEG 化) を応用して, 電気泳動での ALB の分離について検討した.

【方法】 実験には, ウシ血清 ALB (BSA) とヒト血清 ALB (HSA) の精製試薬を使用した. PEG-mal は20kDaを使用した. 手順として, まず, リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) で溶解した ALB 溶液

と PEG-mal 溶液を混合して室温で30分間 PEG 化処理を行った. 次に, その反応液とサンプルバッファー (SDS, メルカプトエタノール) を混合して変性処理を行い, ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE, 分離ゲル濃度7.5%) に用いた. 電気泳動後, ゲルは CBB 染色して写真を撮影した. バンドの解析は, 画像解析ソフトの ImageJ を使用して行った. その他, ALB の遊離 SH 基量を DTNB 法を用いて比色定量し, 電気泳動の結果と比較した.

【結果及び考察】 BSA と HSA は, いずれも PEG 化処理によって2本のバンドに分離した. 分子量は, それぞれ100kDa と65kDa であった. 電気泳動での還元型 ALB と酸化型 ALB の比率は, BSA は55%と45%, HSA は35%と65%であった. 一方, DTNB 法での比率は, BSA は53%と47%, HSA は33%と67%であった.

還元型 ALB と酸化型 ALB は, PEG 化処理によって電気泳動で分離できることが分かった. しかし, 血漿への応用においては, ALB 以外のたんぱく質との分離について, さらに検討する必要がある.

【結語】 還元型 ALB と酸化型 ALB は PEG 化処理によって電気泳動で分離できることが分かった.