

## P-6 染色セルロースアセテート膜からニトロセルロース膜へのアルカリ転写および

### アルカリダブルブロッキング法によるM蛋白質判別

栗原映見<sup>1)</sup>、藤村瑠意<sup>2)</sup>、田平未希子<sup>2)</sup>、岡山直子<sup>2)</sup>、服部幸夫<sup>3)</sup>、新田孟徳<sup>4)</sup>、山城安啓<sup>4)</sup>、○田中経彦<sup>4)</sup>

1) 福山臨床医学センタ、2) 山口大学附属病院検査部、3) 済生会山口総合病院、4) 山口大学医学研究科

ブロッキング膜上の蛋白をポンソー等で染色後、脱色、抗体検出する技術に対し、蛋白染色後のセア膜の抗体検出法を検討した。ポンソー3R染色後のセア膜を、水洗後、転写膜に重ね、NaOH液を膜上に重層すると、蛋白は転写膜（ニトロセルロース膜）へ転写された（これをアルカリ転写法と呼ぶ）。7M塩酸グアニジン水溶液を転写液にするとアルブミンがセア膜に残留するが、0.1%NaOH液を転写液として使うと、完全に溶出転写される。一方、ダブルブロッキングとは転写膜上の抗原タンパクに抗体を結合させた後、酸性液で抗体を遊離させ別の転写膜に転写検出する方法である（Lasne, F. J. of Immunological Method 2001; 253; 125-131）。しかし、酸性転写液等では抗体の転写が不十分で、7M塩酸グアニジウム溶液等を検討したが、転写元膜から抗原（ヒト血清アルブミン）の一部溶出が起こる。対して0.1M NaOHで転写洗浄染色を5回繰り返しても血清蛋白の溶出はなかった。セア膜から蛋白をアルカリ転写、転写膜をN101ブロッキング、抗体反応、洗浄、ダブルブロッキング、染色と

処理したところ、泳動で検出されたM蛋白のクラスやL鎖タイプを、正確に判定できた。市販ヒトミエローマ蛋白質を混入したヒト血清で検出感度等を検討中である。自動泳動装置で泳動後、長期乾燥していた膜にはアルカリ転写しても元膜に残存が見られた。原因は、乾燥、膜透明化処理が考えられるが検討中である。

多重抗体染色において、抗体を除去するのに、転写膜を重ねてアルカリ転写すれば、抗体は転写膜に吸着するため元膜への抗体残留（クロスが少ない効果も期待できる。強アルカリ性で抗原タンパクの脱アミド脱リン酸等が起こり抗原性低下の可能性はあるが、エレクトロブロットに比べセッティング等が簡易迅速と言える。高感度ECL検出には低蛍光PVDF膜を転写膜にする必要があるが、転写液の透過がニトロセルロース膜に対し遅い。また、セア膜等電点電気泳動法等でも、固定染色した膜から転写膜へ、アルカリ転写固定すると、保存が容易、再使用が可能で、抗原や自己抗体検出などへの、臨床検査室での幅広い応用を期待する。