

和光純薬工業株式会社



化学発光法を用いた超高感度イムノプロットングキット ImmunoStar Kit

特長

化学発光法を用いているため、発色法に比べ数十倍から数百倍の感度が得られます。
発光は数時間持続しますので、長時間の露出によりさらに微量のタンパク質の検出が可能です。
発色法や他の化学発光検出法に比べバックグラウンドが低減されています。
発光後、メンブランの染色も可能です。
リブローピングが可能です。
イムノプロットングに必要なすべての試薬がそろっています。

内容

- | | |
|--|-----------|
| 1) ブロッキング溶液 | 130ml |
| 2) 抗マウス(またはウサギ) IgG(H+L), ヤギ, ビオチン結合(100×) | 1.3ml |
| 3) ABC 原液(100×) | 1.3ml |
| 4) 希釈用緩衝原液(10×) | 30ml |
| 5) 洗浄原液(20×) | 2 × 165ml |
| 6) 発光溶液 A | 70ml |
| 7) 発光溶液 B | 70ml |
| 8) 発光溶液 C | 30ml |

コード No.	品名	規格	包装	希望納入価格(円)
291-54603	ImmunoStar Kit for Mouse	プロットング用	1000cm ² 用	25,000
297-54703	ImmunoStar Kit for Rabbit	プロットング用	1000cm ² 用	25,000

キットの性能につきましては、p.9 をご参照下さい。

目次

化学大家	_____
「アントン ヘルツ」 芝 哲夫.....	2
総説	_____
「重水素標識化ヌクレオシドの構造生物学への利用」 川島 悦子.....	6
「Cap Site cDNA™ の開発と有用性」 嶋本 頭、古市 泰宏.....	10
シリーズ	_____
< Talking of LAL >	
「第 32 話 エンドトキシンとサイトカイン」 土谷 正和.....	16
< How to アポトーシス >	
「第 3 話 アポトーシスの検出法 - DNA 断片化の解析法」 塩川 大介、丸田 英晴、田沼 靖一... 18	
< 免疫一口メモ >	
「インスリン依存型糖尿病における遺伝的背景および液性免疫の意義」 今村 稔、青木 矩彦.....	22
テクニカルレポート	_____
「大気中のアルデヒド、ケトンの HPLC 分析」 上森 仁志.....	28
新製品フラッシュ	_____
イムノスターキット.....	1,9
E-4031、TGF-β(ヒト) 他.....	5
トリス(トリメチルシリル) シラン-d ₉ 99%.....	8
(株)ニッポンジーン Cap Site cDNA™.....	13
DNA エキストラクター WB ラビッドキット... 14	
(株)ニッポンジーン Drop PCR キット、他... 15	
リムルス PS シングルテストウエー.....	17
アポトーシスラダー検出キットウエー.....	19
抗プレセニリン-1(N-末端), ヤギ、パラフィン切片染色用 Fas、Fas-L 抗体.....	20
Genzyme 社 アネキシン キット.....	21
幹細胞因子, マウス, 組換え体、血球染色試薬.....	23
病理用パラフィン パソプレップ 568、他... 24	
水質試験用試薬、トルエン.....	25
32 種農薬混合標準液、他.....	26
マイクロシスチン分解物標準品.....	27
ダイオキシン類分析用化学修飾シリカゲル... 29	
プレセップ® C シリーズ.....	30
クロマトシート.....	32
お知らせ	_____
STRATEGIC DIAGNOSTICS INC. DIOXIN RIS® TEST 大幅値下げ、ステンダイマー・トリマー近日発売、お客様相談室開設.....	31

アントン ヘルツ (1843-1883)

大阪大学名誉教授 芝 哲夫

明治初年に来日し、長崎医学校で化学を教授し、京都、横浜司薬場創設に参画し、日本薬局方草案を作成するなど、わが国の化学教育、衛生行政に尽力して、日本を愛し、日本に骨を埋めたオランダ人薬学者 A. ヘルツについて紹介する。

Anton Johannes Cornelis Geerts ヘルツは1843年3月24日にオランダのオウデンダイク Oudendijk に言語学者の子として生まれた^{1,2)}。ユトレヒト大学薬学科に学び、当時のオランダ化学の中心人物であった G. J. ムルダール Mulder に嘱望されて、卒業後ユトレヒト陸軍軍医学校の化学教官に就任した。この学校からは多くの医官が長崎の出島に派遣されていた。それが機縁になってヘルツも日本に深い関心を持つに至った。特に長崎商館医として日本人に化学教育を行ってオランダに帰国した J. K. ファン・デン・ブルク Van den Broek³⁾の日本についての講演を聴いて日本行きの夢が掻き立てられた。

ヘルツは1868年(明治元年)に長崎医学校予科の理化学教師として推薦され、翌年7月1日に長崎に到達した。長崎では幕末に精得館でオランダ人教師による医学教育が行われていたが、維新に際して、それが明治政府の下に長崎医学校として再出発することになり、長与専齋校長がオランダ人教師 C. G. ファン・マンスフェルト Van Mansvelt と謀って学制改革を計画し、予科の理化学教師に新たにヘルツを迎えられたのである¹⁾。医学教育の基礎としての理化学の重要性が改めて認められたからである。

この長崎医学校でヘルツに学んだ京都の小石第二郎の記録によると、6年間の修業年限の中の最初の2年間で基礎教育に充てられ、算術、代数、



写真 1. アントン ヘルツ

幾何、機械学、物理学、解剖学、生理学、病理学とともに化学として、無機化学、有機化学の講義が行われた^{2,4)}。

ヘルツは間もなく長崎生まれの十歳年下の山口きわと結婚した。来日して日本人妻と結婚するが、帰国に際して別れて帰るお雇外人が多い中で、ヘルツはその死まできわと添い遂げた。

ヘルツは長崎医学校で輸入薬品を教材として分析実験を行っていた関係で、不良薬品の取締りが急務であることを痛感した。明治6年(1873)1月に長崎在住のオランダ人 A. ファン・デ・ポルの贗造薬品取締要望書にヘルツは見本のキナ塩の分析を行った結果を添えて長崎税関に提出した。このことが契機となって、同年9月に文部省から司薬場設置の伺書が出され、翌年には東京司薬場が開設される運びとなった。ヘルツの長崎での具申がわが国の衛生試験所の発端を開いたといえる。

当時の文部省医務局長であった長与専齋はこの東京司薬場にヘルツ

を迎えようとしたが、ヘルツはこの時、長崎病院に入院中であったので、代わりにドイツ人 G. マルチン Martin がその監督となった。ヘルツは病氣回復後、明治7年(1874)に上京して、長与局長の顧問となって直接わが国の衛生行政にたずさわることとなった。

明治8年(1875) 京都司薬場が新設されるやヘルツはその監督となって赴任した⁵⁾。この時、医務局は文部省から内務省に移され、新たに衛生局と改称された。京都司薬場はその前に開設されていた京都舎密局の設備を借り受けることになったが、その代わりにヘルツは舎密局の生徒に理化学、動植物学、鉱物学の講義を行った。その時の講演記録「京都舎密局開業記」が残されている⁶⁾。同年7月には第1回薬舗開業試験が全国に先駆けて京都府において実施された。そのための講習会でヘルツは物理学、化学、薬剤学、などの教授を行った。わが国薬剤師教育の最初であるといえる²⁾。京都時代のヘルツは周辺の鉱物、生薬類を収集し、明治8年(1875)の第4回京都勲業博覧会に多くの鉱物標本を出品して銀メダルを贈られた。またその頃、有馬温泉や平野鉱泉の成分分析も行っている。

ヘルツは京都滞在中に長与衛生局長の委嘱を受けて大阪司薬場監督 B. ドワルス Dwars と協力して、わが国最初の「日本薬局方」の蘭文草案の作成を開始した。これは「オランダ薬局方」第1版をもとにして作られたもので、ヘルツが横浜司薬場に移動後の明治10年(1877)に完成したが、その原稿は原稿紙588枚に及ぶ歴大なものであった。明治14年(1881)にはヘルツは日本薬局方制定委員に任ぜられた。しかしオランダ薬局方が改正されたこともあり、その後まもなく

ヘルツが急逝したので、その苦心の草稿(写真2)は遂に公にされることなく、現在も国立医薬品食品衛生研究所(旧 国立衛生試験所)に保管されている⁷⁾。明治19年(1886)に公布された最初の日本薬局方はオランダ薬局方第2版によって作成されたもので、ヘルツの草案は結果的には利用されなかった¹⁷⁾。

明治9年(1876)に、京都司薬場は薬物が外国から到着する臨海都市から遠いという理由でわずか開設1年半後に閉鎖されることになった⁵⁾。ヘルツは京都を去り、一時マルチンの任期満了で空席となっていた東京司薬場の監督代行を勤めたが、明治10年(1877)に新設の横浜司薬場の監督となって赴任した⁸⁾。横浜司薬場ではヘルツは分析技術、製薬法の指導に力を注いだ。たとえば、サルサエキスやヒヨス油浸など100種の生薬製剤はその純度を判別し難いので薬品として取り扱わないように衛生局に上申してそれが認められた。またコレラの流行に際して、神奈川県当局と折衝して、長浦消毒所や避病院の設立に奔走し、検疫停船規則や伝染病予防規則の制定に尽力した¹²⁾。

ヘルツには化学、薬学、衛生学の本業の他に、日本研究や鉱物学研究所の業績がある。前者については明治2年(1869)から6年(1873)にわたる間の日本の政治、教育、貿易などに関する詳細な調査報告に独自の論評を加えて、1年毎にオランダで発表されたものが和訳されて、『ヘルツ日本年報』として出版されている¹⁾。この期間は日本という国が近代化に向けて未曾有の変革を迫られた時で、それに対する外国人から見た貴重な観察と意見に満ちている。しかしその底を流れているものはヘルツの日本に対する暖かい愛情で、イギリスに対する激しい対抗意識や、キリスト教に対する厳しい批判も見受けられる。後者の鉱物学研究に関しては、明治8年(1875)から10年(1877)にかけて行われた研究結果が和蘭陀教師ア・エ・セ・ゲールツ著『新撰本草綱目』第巻、貳篇 礦物之部 明治11, 16年として発表された(写真3)。内容は全文フランス語で書かれた“Les Produits de la Nature Japonaise et Chinois” 1878-1883である。これは『本草綱目』その他の和漢書のうちの鉱物の部分を系統的に調べて解説したものである。

このほかに、ヘルツの著書として、成嶋謙吉訳『日本温泉獨案内』明治12年(1879)、桑田知明訳『日本温泉考』明治13年(1880)が知られている。これらは明治14年(1881)のフランクフルトにおける万国博覧会に、ヘルツが内務省衛生局から依頼され、日本全国の温泉成分分析を行った報告書に当たるものである²⁾。また明治13年(1880)の政府刊行『日本鉱泉誌』もこの時のヘルツの力に負うものである⁸⁾。なおコトレヒトの陸軍軍医学校時代に“Beginselen der quantitative analytische scheikunde ten bruike bij het hooger en middelbaar onderwijs, 1867”(中等高等教育用定量分析化学の基礎)の著作がある。

またヘルツは日本の植物学の草分けの伊藤圭介と親交があった。明治15年(1882)の圭介の80歳誕生祝賀会に招かれたヘルツは「日本の植物学者伊藤圭介の80歳誕生祝賀会」と題する一文をオランダの学術雑誌に投稿している²⁾。ヘルツはまた日本アジア協会副会長を勤めて、同協会のTransactionなどに20数報の日本に関する報告を発表している¹²⁾。

このような日本の深い理解者ヘル



写真2. ヘルツ『日本薬局方草案』稿本
国立医薬品食品衛生研究所(旧 国立衛生試験所)蔵

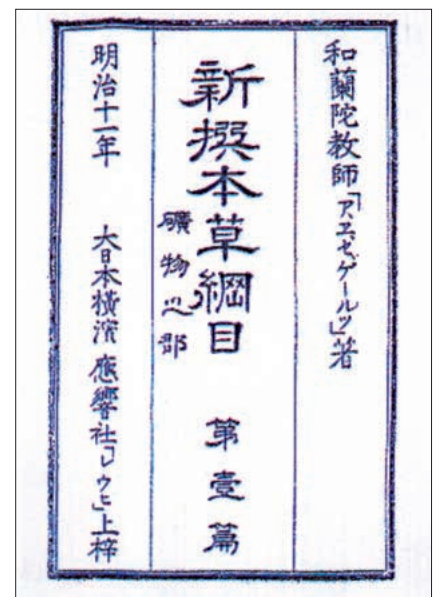


写真3. ヘルツ著『新撰本草綱目』
内容はフランス語で書かれている



写真 4. 横浜外人墓地のヘールツと夫人きわの墓碑



写真 5. 国立医薬品食品衛生研究所(旧 国立衛生試験所) 構内にあるヘールツ顕彰碑

ツは横浜に在勤中の明治16年(1883)腸チフスに罹り、同年8月30日忽然と世を去った。享年40歳であった。後には愛妻きわとともに6人の幼い娘が残された。日本政府は勲四等、旭日小綬章を贈ってその功に報いた。ヘールツに深い信頼を置いていた長与専斎はヘールツの娘達を手厚く庇護するとともに、横浜の外人墓地に白亜大理石の墓碑(写真4)を建ててその死を惜しんだ。さらに明治24年(1891)8月30日の没後8年目の祥月命日に専斎の発起で上野谷中天王寺墓地内にヘールツの顕彰碑が建立され、専斎の撰文でヘールツの功績が称えられた。この顕彰碑(写真5)は現在、世田谷用賀の国立医薬品食品衛生研究所(旧 国立衛生試験所)前庭に移されている^{1,8)}。

ヘールツ夫人きわは麻布でドレスメーカー - を経営する娘のもとに身を寄せて余生を送り、昭和9年(1934)11

月16日に81歳で亡くなり、ヘールツの墓の傍らに葬られた。最近になって、第二次大戦中の欧州でオペラ蝶々夫人で名声を博したプリマドンナ喜波貞子(きわていこ)のことが日本で知られるようになった⁹⁾。この人こそヘールツの残した娘の子、つまり孫娘で、横浜に生れ、17歳でミラノへ渡り、蝶々夫人で欧州オペラ界にデビューしたレティツィア・ジャコバ・ヴィルヘルミナ・クリンゲンであった。喜波貞子は祖母きわを慕ってつけた芸名である。日本の薬学の恩人ヘールツの残した余韻であった。

御教示を賜った向井晃氏と写真撮影の御便宜をおはかり下さった田中彰氏に厚く感謝申し上げます。

〔参考文献〕

- 1) 庄司三男訳『ヘールツ日本年報』新異国叢書 第 輯 5、雄松堂出版、昭和58年。
- 2) 庄司三男「A. J. C. ヘールツの生涯とその業績」日蘭学会会誌、9(2)157(1985)。
- 3) 芝哲夫「河野禎造」和光純薬時報、61(3)1(1993)。
- 4) 松田清「小石二郎とヘールツ」究理堂創設200年記念講演、京都、京都医学史研究会 日本医史学会関西支部、洋学史学会、平成9年5月18日。
- 5) 芝哲夫「明石博高」和光純薬時報、65(3)1(1997)。
- 6) 向井晃「お雇い外国人 A.J.C. ヘールツの「京都舎密局開業記」」東海大学紀要課程資格教育センター 第2号、25(1971)。
- 7) 江本龍雄「ゲ - ルツの日本薬局方蘭文草案(1877)について」医薬品研究、14(3)457(1983)。
- 8) 『国立衛生試験所百年史』国立衛生試験所、昭和50年。
- 9) 松永伍一『蝶は還らず - プリマ・ドンナ喜波貞子を追って』毎日新聞社、1990。

細胞内シグナル伝達研究用試薬

K⁺ Channel Blocker

E-4031

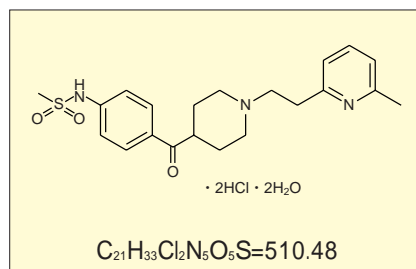
生化学用

神経細胞、筋細胞をはじめとする興奮性細胞の機能を巧妙に調節している多種多様な K⁺チャネルは、電位依存性 K⁺チャネル(遅延整流、A 電流)内向き整流型、Ca²⁺依存性 K⁺チャネル、ATP 感受性 K⁺チャネルなどに大きく分類されます。

抗不整脈薬Ⅲ群薬の基本骨格の一つメタンスルホンアニリドをもつ K⁺

チャネルブロッカー E-4031 は、筋細胞の脱分極後の再分極の際、遅延整流 K 電流の内の rapid な成分 I_{Kr} を選択的に抑制します。

筋に分布する K⁺チャネルのパネリング、メタンスルホンアニリドをもつ薬剤の開発補助手段のツール等、K⁺チャネルの持つ様々な機能研究に用いられます。



[規格]

含量(HPLC): 98.0% 以上

水 溶 状 : 限度内

056-06521	1mg	照 会
052-06523	10mg	照 会
050-06524	100mg	照 会

TGF-β₁ 【Transforming Growth Factor-β₁】from Human Platelets

生化学用

TGF-β₁ は細胞の増殖と分化の調節、骨形成の促進、コラーゲンとフィブロネクチンの産出促進、そして造血過程など多くの重要な役割を演じている、分子量約 25kDa の 2 量体タンパク質です。TGF-β は細胞膜上の受容体に結合し細胞内のシグナル伝達分子を介する事によりシグナルを細胞核に伝えます。Smad の様なシグナル伝達分子の異常や細胞周期を制御する遺伝子に異常があると TGF-β から正確なシグナル伝達が伝わらなくなり、正常細胞のがん化を引き起こす事が指摘されています。また、マウスを用いたモデル実験ではアルツハイマー症候

群を加速し、β アミロイドの沈着を促進させた報告がなされています。この様に TGF-β とその受容体、活性化によって起こるシグナル伝達物質との相関関係が現在も詳しく研究されています。

[参考文献]

- 1) Takaku, K., Oshima, M., Miyoshi, H., Matsui, M., Seldin, M.F. and Taketo, M.M.: *Cell*, 92, 645 (1998)
- 2) 竹之下誠一、茂木晃、宮園浩平: *生体の科学*, 48, 502 (1997)
- 3) 辻 孝、中村敏一: *実験医学*, 8, 330 (1990)
- 4) Wakefield, L.M., Lioubin, M.N., Purchio, A. F. and Marquardt, H.: *Mol. Cell. Biol.*, 8, 4162 (1988)

- 5) Wyss-Coray, T., Masliah, E., Mallory, M., McConlogue, L., Johnson-Wood, K., Lin, C. and Mucke, L.: *Nature*, 389, 603 (1997)

202-14231 2μg 40,000 円



Poly-L-lysine Hydrobromide 0.1w/v% Poly-L-lysine Solution

生化学用

細胞膜が負に帯電していることから細胞をマトリックス/支持基材に安定に吸着・保持するのに汎用されています。特にポリ-L- リシン臭化水素酸塩の水溶液 (0.1% w/v) は調製することなくそのままスライドガラスに塗布でき、組織切片の固定・免疫組織染色に汎用されます。特に切片をプロテアーゼ処理したり、インキュベーションが長時間に亘るような時に有用な試薬です。

[参考文献]

- 1) 河田光博、森本昌史、由利和也、森田規之: 第 18 回組織細胞化学講習会 組織細胞化学 1993, p76 (1993)
- 2) Tanaka, Y., Meera, P., Song, M., Knaus,

H-G. and Toro, L.: *J. Physiol.*, 502, 3, 545 (1997)

- 3) 病理技術研究会編: 「病理標本の使い方」, p.34, (分光堂 1992)

コード No.	品 名	容 量	希望納入価格(円)
160-18641	Poly-L-lysine Hydrobromide M.W. 1,000 ~ 4,000	100mg	10,000
166-18643		500mg	35,000
167-18771	Poly-L-lysine Hydrobromide M.W. > 300,000	100mg	10,600
163-18773		500mg	38,000
167-18651	0.1w/v% Poly-L-lysine Solution	100ml	9,000

重水素標識化ヌクレオシドの構造生物学への利用

東京薬科大学 薬学部 川島 悦子

DNA およびタンパク質の立体構造をもとに生命現象を理解しようとする“構造生物学 (structural biology)”の分野が 1980 年代末からヨーロッパを中心に発展してきた。遺伝子の発現段階には、RNA を合成する酵素タンパク質以外にも調節を行うタンパク質が種々知られている。このようなタンパク質と DNA とが認識している複合体がどのようなコンホメーションをとっているかを解明する手段としては、主として X 線解析と NMR 法が中心に用いられている。NMR 法には安定同位体で標識された化合物が有用であるが、安定同位体標識化ヌクレオシドの化学はアミノ酸のそれと比して出遅れており、現在のところ DNA 側から得られる構造情報はタンパク質側に比して少ない。そこでこの安定同位体標識化ヌクレオシドの効率的合成法を開発し、その合成法で得られた安定同位体標識化オリゴマーを用い、核酸側からの正確な情報を得ようと NMR 研究者と共に研究に取り組んだ。今回は安定同位体の中の最も汎用されている重水素に焦点を絞り、オリゴマーの構造解析、更に特定部位を重水素化したヌクレオチドを組み込んだオリゴマーを利用した薬物による DNA 切断機構の解明も

併せて紹介する。

核酸の構造解析

核酸とタンパク質の相互作用、あるいは tRNA やリボザイムの様な核酸同士の間相互作用の解明には、その構成単位の各ヌクレオチドの構造解析が重要な役割を担っている。

核酸の全体構造は、主としてフラノース環のコンホメーション(糖部パッキング)と糖-リン酸バックボーンのねじれ角の幾何構造とあわせて定義される(図 1)。この際、核酸の NMR スペクトルは、繰り返し存在するフラノース部分がかかなり複雑なシグナルになる。特に 2' 位および 5' 位のメチレンプロトンは重なり合いが激しく、H2' および H2'' あるいは、H4', H5' および H5'' の帰属は困難であり、そのため正確な情報が得難い。このような問題の解決方法として、重水素で標識されたオリゴヌクレオチドを用いた構造解析が行われるようになった。

核酸の糖部パッキングの解析

糖部分の詳細なパッキングの解析として、まず高立体選択的(2'R) およ

び(2'S)-2'-デオキシ [2'-²H] リボヌクレオチド類の合成法を開発^{1,2)}し、これを用いて(2'R) および(2'S)-[2'-²H] DNA 10-mer [α G*C*A*T*T*A*A*T*G*C*] をそれぞれ合成した。京極先生らによりこの標識化 DNA 10-mer の糖部分の詳細な解析が行われた³⁾。図 2 に未標識体(中央)(2'R) および(2'S)-[2'-²H] DNA 10-mer の 2' 位の領域の DQF-COSY を示す[(2'R) 体:左、(2'S) 体:右]。この NMR チャートから明らかな様に特定部位を高立体選択的に重水素化したオリゴマーを用いると、NMR のシグナルが劇的に明瞭になった。この結果この配列でそれまで帰属できなかった 2' 位のプロトンのシグナルが帰属でき、さらにパッキングの決定に

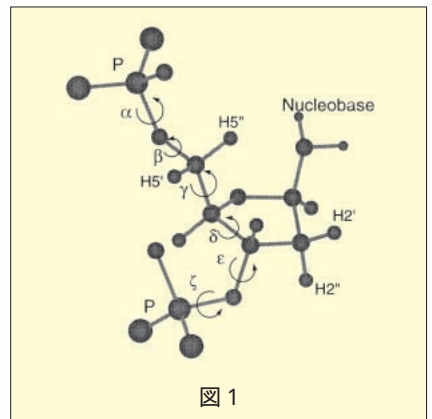


図 1

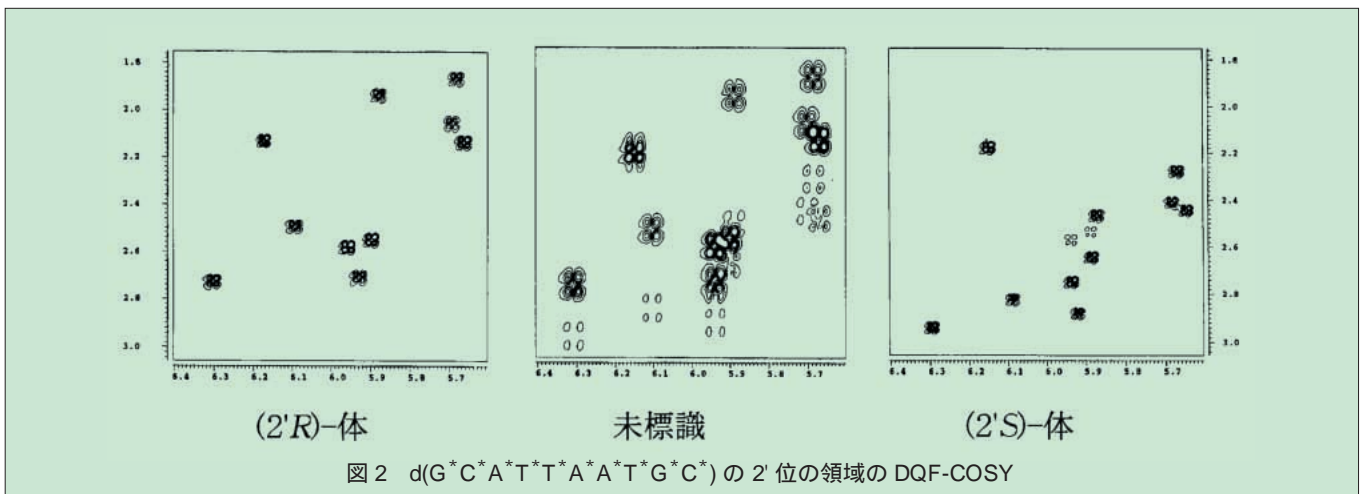


図 2 d(G*C*A*T*T*A*A*T*G*C*) の 2' 位の領域の DQF-COSY

必要な結合定数が正確に求められ、それらのコンホメーションを決定することができた。

核酸の糖 - リン酸バックボーンの構造解析

糖 - リン酸バックボーンの NMR による構造解析は、解析に必要な H4'、H5' および H5'' のシグナルが同じ領域に現れ複雑に重なり合うため非常に困難である。そこで筆者らは (5'R) / (5'S) 比に偏りをもたせた 2'-デオキシ [5'-²H]ヌクレオシド類の合成法⁴⁾を開発した。次いで、甲斐荘先生らによりこの (5'R) / (5'S) 比に偏りをもたせた [5'-²H]DNA 12-mer [α C*G*C*G* A*A*T*T*C*G*C*G*] の解析が 2D HSQC 法を用いて行われた。その結果、5' 位の全てのプロトンの帰属が達成され、さらに現在まで小さくて測定不可能だったリンと 5' 位のプロトンとの J 値 (カップリング定数) が求められた⁵⁾。

薬物の DNA 鎖切断機構の解明

分子内のある原子を同位体で置換した時、物理的、化学的挙動に差を生じることを同位体効果という。特定部位を重水素化しこの種の同位体効果を利用すれば、抗腫瘍性抗生物質や合成 DNA 切断剤による DNA 鎖の切断反応の機構が解明され、DNA 鎖切断分子の認識機構に関する重要な情報が得られることになる。抗癌剤 bleomycin (BLM) は鉄あるいはコバルトと安定な錯体を形成し DNA を切断すると報告⁶⁾されており、4'-位に重水素を導入したチミジンを組み込んだオリゴマーを用いることによりその機構が証明されている。

杉山先生らはイドクスウリジンの様な抗腫瘍活性を持つ 5-ハロウリジル酸を含む DNA に光照射を行うと、ウリジル酸部の 5 位にラジカルが形成され、

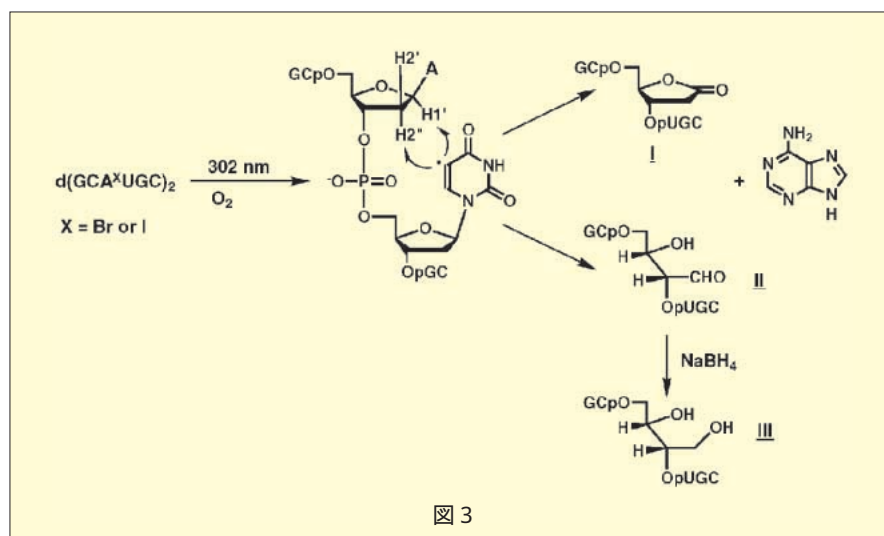


図 3

そのラジカルが DNA 鎖を切断したり、DNA-タンパク質架橋構造を形成したりすることに着目し、この機構を解明することを試みた。筆者らと共同研究により、高ジアステロ選択的に重水素化した (2'R) および (2'S)-2'-デオキシ [2'-²H] アデノシンのそれぞれを、5-ハロウリジル酸残基の 5' 側に組み込んだヘキサヌクレオチドを合成し、それらの光反応を行ない 1' 位および 2' 位の水素の引き抜き機構を検討した。各々について速度論的同位体効果を測定した結果、図 3 に示すように 1' 位で水素の引き抜きが起こると共に、2' 位では 2''-水素が引き抜かれ切断が開始されることを明らかにした⁷⁾ (図 3)。

このような高次の構造解析、機構解明を可能ならしめたのは特定部位の高立体選択的重水素標識化ヌクレオシド類の有機化学的合成法を達成した成果による。そこで最後にそれらの合成法を記したい。

重水素標識化ヌクレオシドの合成法

安定同位体標識化合物の合成法は (a) 安定同位体標識微生物から抽出する方法 (抽出法) (b) 微生物発酵法により生産する方法 (発酵法) (c) 有機化学的合成法に分類される。しかし特

定部位の、あるいは高ジアステロ選択的な標識化は有機化学的合成法に頼らざるを得ない。

立体選択的重水素標識化ヌクレオシド類の合成:

現在重水素標識化ヌクレオシド類の合成法のうち (2'R) および (2'S)-2'-デオキシ [2'-²H]ヌクレオシドの合成法は、Robins ら⁸⁾、Chattopadhyaya ら⁹⁾、および筆者ら^{1,2)}によりほぼ確立されている。筆者らは、ジアステロ選択性を高めるべく、分子運動を抑制させるため保護基および反応温度、さらにその温度で作用するラジカル開始剤を検討し Bu₃Sn²H を重水素化試薬として、98% de (ジアステロ過剰率) 以上の (2'R)-2'-デオキシ [2'-²H]ヌクレオシドを合成する方法を開発した。ところで近年ラジカル還元剤としてトリストリメチルシリルシランの研究が報告¹⁰⁾されている。この試薬と Bu₃SnH の供与水素原子とケイ素原子およびスズ原子との結合エネルギーと結合距離を比較すると、(Me₃Si)₃SiH のほうが結合エネルギーは大きく、結合距離は短い。このため (Me₃Si)₃SiH は反応の遷移状態において発生したラジカルに、より接近しなければならない。さらに、Bu₃SnH の 3 つブチル鎖はフレキシブルで有るのに対し、(Me₃Si)₃SiH の 3 つの Me₃Si 基は混み合っ

ているためかなり固定されている。このため $(\text{Me}_3\text{Si})_3\text{Si}^2\text{H}$ は発生したラジカルの周囲の立体障害に大きく影響される。これらの特徴を有する重水素化トリストリメチルシリルシラン $(\text{Me}_3\text{Si})_3\text{Si}^2\text{H}$ を重水素化剤とすれば、高立体選択的の重水素化体が得られると予測される。さらに反応温度を -78 という低温にしなくても高い立体選択性が得られると推察し、 $(\text{Me}_3\text{Si})_3\text{Si}^2\text{H}$ を $\text{Bu}_3\text{Sn}^2\text{H}$ の代わりに用いる検討を行った。その結果、 $\text{Bu}_3\text{Sn}^2\text{H}$ では -78 という低い反応温度で初めて得られる $98\% \text{de}$ 以上の高ジアステレオ選択比を、 $(\text{Me}_3\text{Si})_3\text{Si}^2\text{H}$ では室温で達成できることを見出した¹¹⁾。反応式 (Scheme 1) と得られた NMR チャート (図 4) を示す。

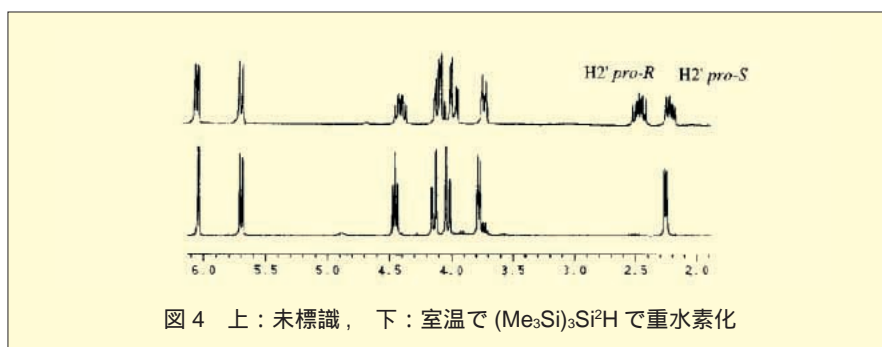
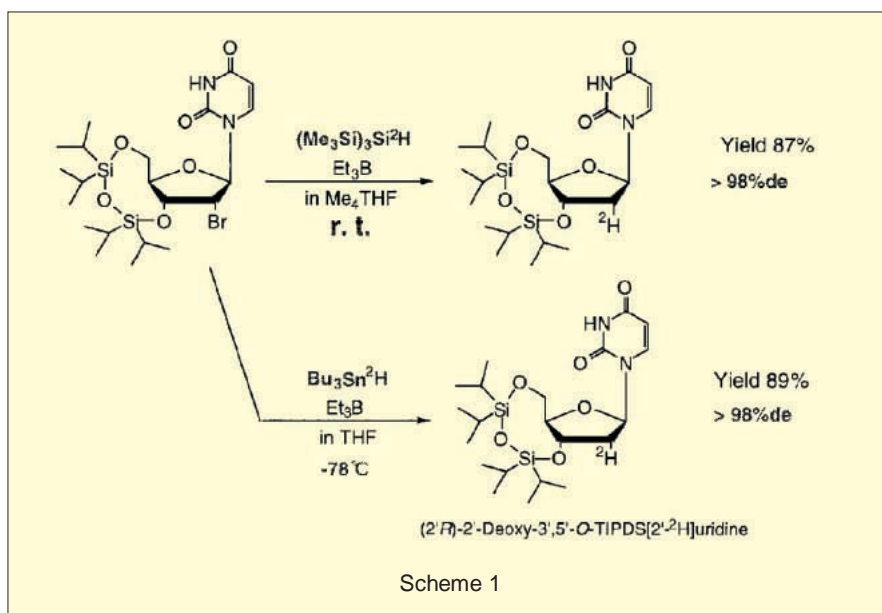
さらに最近問題になっている環境ホルモンには、船の塗料である有機錫化合物も対象になっている。使用量は少ないといえ $\text{Bu}_3\text{Sn}^2\text{H}$ は反応後生成するヘキサブチルスタノキサンの毒性が強く、しかも反応混合物からの完全な分離が困難であるのに対し、 $(\text{Me}_3\text{Si})_3\text{Si}^2\text{H}$ は無害であり、分離も容易である。このことから、この試薬は今後さらに利用価値が増大すると考えられる。

おわりに

重水素化ヌクレオシドの構造生物学への利用の一端を述べた。生命のしくみの研究は今後益々盛んになり解明がなされてゆくことであろう。その中で、NMR 法に有用な安定同位体標識化合物の効率的合成法がさらに開発されるならば、生命のしくみの詳細な解明に寄与できると期待される。

〔参考文献〕

- 1) Kawashima, E., Aoyama, Y., Sekine, T., Miyahara, M., Radwan, M. F., Nakamura, E., Kainosho, M., Kyogoku, Y. and Ishido, Y. : *J. Org. Chem.*, **60**, 6980-6986 (1995)
- 2) Kawashima, E., Aoyama, Y., Miya-



- hara, M., Sekine, T., Radwan, M. and Ishido, Y. : *Nucleosides & Nucleotides*, **14**, 333-336 (1995)
- 3) Kojima, C., Kyogoku, Y., Ishido, Y., Kawashima, E., Sekine, T. and Kainosho, M. : *Nucleic Acides Symp. Series.*, **29**, 185-186 (1993)
- 4) a) Kawashima, E., Toyama, K., Ohshima, K., Kainosho, M., Kyogoku, Y. and Ishido, Y. : *Tetrahedron Lett.*, **36**, 6699-6700 (1996)
b) Kawashima, E., Toyama, K., Ohshima, K., Kainosho, M., Kyogoku, Y. and Ishido, Y. : *Chirality*, **9**, (5/6), 435-442 (1997)
- 5) Ono, A., Makita, T., Tate, S., Kawashima, E., Ishido, Y. and Kainosho, M. : *Mag. Res. in Chemistry.*, **34**, s40-s46 (1996)
- 6) Sugiyama, H., Sera, T., Dannoue, Y. and Saito, I. : *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2290-2295 (1991)
- 7) Sugiyama, H., Saito, I., Kawashima, E. and Ishido, Y. : *Tetrahedron Lett.*, **37**, 1805-1808, (1996)
- 8) Robins, M. J., Wilson, J. S. and Hansske,

- F. : *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4059-4065 (1983)
- 9) Pathak, T., Bazin, H. and Chattopadhyaya, J. : *Tetrahedron*, **42**, 5427-5441 (1986)
- 10) a) Kanabus-Kaminska, J. M., Hawarii, J. A., Griller, D. and Chatgililoglu, C. : *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5267-5268 (1987). b) Giese B., Kopping B. and Chatgililoglu, C. : *Tetrahedron Lett.*, **30**, 681-684 (1989)
- 11) Kawashima, E., Uchida, S., Miyahara, M. and Ishido, Y. : *Tetrahedron Lett.*, **38**, 7369-7372, (1997)

◆New Products◆

Tris(trimethylsilyl)silane-d, 99%

201-14181 200mg 25,000 円

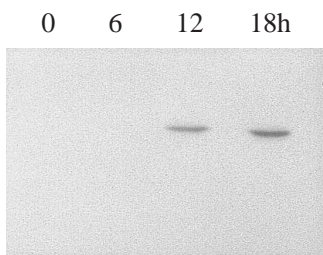
化学発光法を用いた超高感度イムノブロットングキット

ImmunoStar Kit

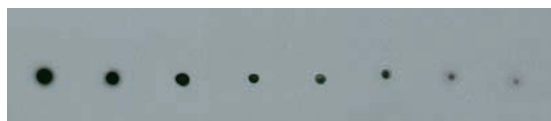
ドットブロットングやウエスタンブロットングなどイムノブロットングでは、通常、標識酵素による発色反応が用いられています。しかし、ますます微量化する試料に対し、濃縮や精製といった煩雑な前処理操作を行うことなく、目的のタンパク質を容易に検出できる高感度検出法が求められるようになりました。

本イムノスターキットは、独自のエンハンサーを用いたルミノール-ペルオキシダーゼ検出システムに基づいております。ストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体(ABC)と増感させた化学発光検出系を組合わせた本キットは、RI法の感度に匹敵する程、高感度に目的のタンパク質を検出することができます。

実用例

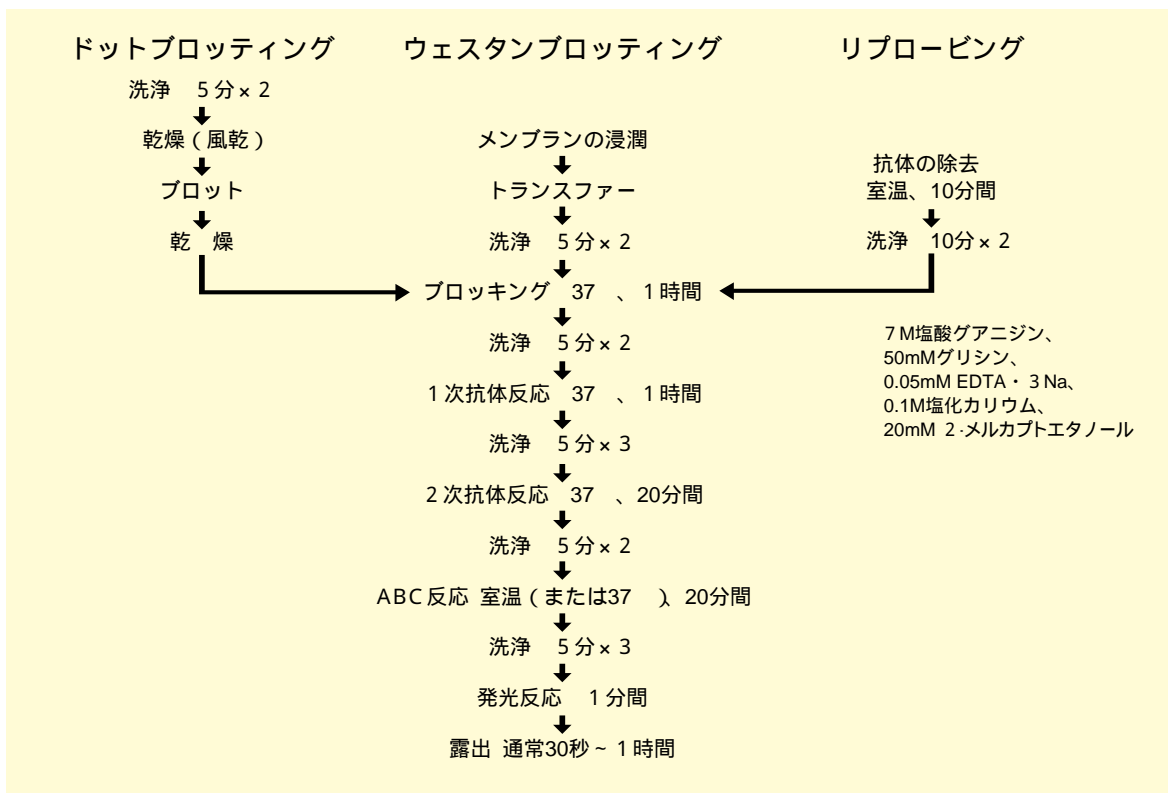


サンプル：抗 Fas 抗体処理 HepG2 細胞
一次抗体：抗ヒト活性化 Caspase-3, ウサギ
露出時間：3 時間



サンプル：ウサギ IgG
(左より 10,5,2.5,1.25,0.625,0.313,0.156,0.078pg)
一次抗体：抗ウサギ IgG(H+L), ヤギ
露出時間：1 分

操作法



コード No.	品名	規格	包装	希望納入価格(円)
291-54603	ImmunoStar Kit for Mouse	ブロットング用	1,000cm ² 用	25,000
297-54703	ImmunoStar Kit for Rabbit	ブロットング用	1,000cm ² 用	25,000

Cap Site cDNA™ の開発と有用性

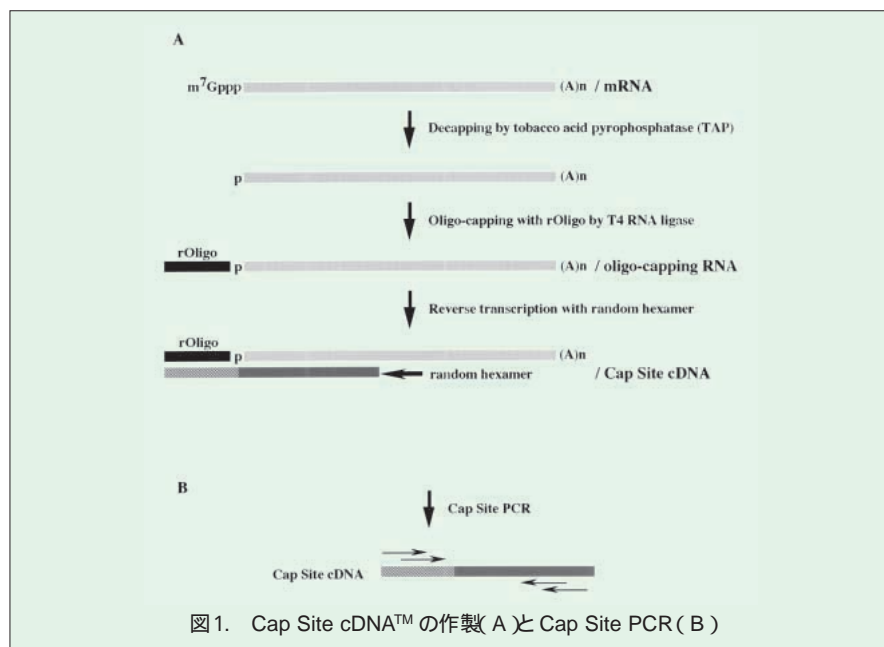
エイジーン研究所 嶋本 顕、古市 泰宏

はじめに

cDNA クローニングを行う研究者なら必ず直面するであろう問題の一つに翻訳開始コドン (first ATG) の同定がある。Northern blot 解析などから、たとえ mRNA のサイズがわかっていたとしても、得られたクローンの 5' 末端まで Open reading frame (ORF) が続いていれば、さらに上流に first ATG が存在する可能性を否定できないであろう。また転写調節領域の解析をするためには、その遺伝子の転写開始点の正確な同定が必須であるが、既存の primer extension や S1 mapping といった方法には実験操作の煩雑さや正確な転写開始塩基の同定ができないといった問題がある。さらに近年進められているゲノム・プロジェクトにおいては遺伝子構造から機能へという研究の流れがあり、翻訳開始コドンと終止コドンを含む 5' 末端から 3' 末端までの情報が重要視されている。これらの必要性から我々は遺伝子の転写開始点 (cap site) を塩基レベルで研究者が確信をもって決定できるシステム Cap Site cDNA™ を開発した。ここで Cap Site cDNA™ の特性とその有用性について紹介する。

Cap Site cDNA™

Cap Site cDNA™ は、丸山・菅野のオリゴキャッピング法¹⁾をもとに、mRNA の 5' 末端に特定の配列をもつ RNA oligo (rOligo) をつなげ、これを鋳型にして逆転写反応を行って得られる single strand cDNA である。図 1 - A にその作製工程を示す。真核生物の mRNA の 5' 末端に m⁷Gppp からなるキャップ構造が存在することは 1975 年 Furuichi らによって報告さ



れ²⁾、この構造が mRNA の安定化や転写・スプライシング、及び翻訳等の mRNA の機能に重要な役割を果たしていることはすでに知られている^{3,4,5)}。mRNA にタバコ酸性ピロホスファターゼ (TAP) を作用させるとキャップ構造のピロリン酸結合が水解され、キャップ構造が除去されるとともに mRNA の 5' 末端にはリン酸基 (5' monophosphate) が残る。このリン酸基を介して rOligo を T4 RNA リガーゼでつなぐことによりオリゴキャップ RNA を作り、次いで random hexamer との逆転写反応により、mRNA の 5' 末端が rOligo に置換した Cap Site cDNA™ が構築される。

以上の反応に供する mRNA はあらかじめホスファターゼ (Calf intestine alkaline phosphatase) で処理しているため、リボヌクレアーゼ等により部分分解された mRNA は Decapping と rOligo-ligation の系には関与しない。即ち、Cap Site cDNA™ は TAP が高純度でヌクレアーゼを含まない限り、キャップ依存的に作られる。実際、

我々は TAP の精製に最大の努力を傾注し、満足できる標品を得るに至り、Cap Site cDNA™ の作製が可能となった。

この Cap Site cDNA™ を鋳型にした PCR により遺伝子の cap site をクローニングすることができる (図 1 - B)。後述するように、Cap Site cDNA™ には rOligo 配列に相当する 2 種類のセンス・プライマーが用意されているので、目的の遺伝子の cDNA 配列に相当するアンチセンス・プライマーと組み合わせれば、PCR によって目的遺伝子の転写開始塩基を含む 5' 上流部分をクローニングできる。キャップを除去した mRNA の 5' 側に付加する rOligo 配列についても、特異性の高い PCR ができるよう特別の配慮を払ってデザインされている。

タバコ酸性ピロホスファターゼ (TAP)

mRNA からキャップ構造を除く酵素、TAP は Cap Site cDNA™ の作製

において重要な酵素である。この酵素は1976年 Shinshiらによってタバコ培養細胞から精製された⁶⁾。TAPを用いて mRNA のキャップ構造を除くためには、その TAP に RNase 等のコンタミがないことが重要であるが、我々の目的に適った高純度な酵素は市販されていなかった。その理由として、キャップ構造を開裂させ、なおかつ、RNA を分解する活性が混入していないことを検定する方法がなかったことが、その理由の一つであった。従って、我々は、TAP 精製度の「物差し」となる高感度検定法の開発により、本法の目的にあった精製度をもった TAP を純化することができた。タバコ BY2 細胞の抽出液を2種類のイオン交換カラムに通した時点で基質 RNA と反応させ、その分解度をゲル上で検定する方法で RNase のコンタミが認められたが(図2 - A: レーン 3, 4) さらに精製を進めゲル濾過の操作を行うことによってこのコンタミを除くことに成功した(図2 - A: レーン 2)。

さらに、この精製標品が mRNA のキャップ構造を特異的に除去するかを

ワクシニアウイルスの poly (A) + RNA を用いて検定した。ワクシニアウイルスの mRNA はキャップ構造中のグアニンと、RNA の 5' 末端のグアニン或いはアデニン残基の2カ所がメチル化を受けている。そこでこれらのメチル基を ³H で、さらに RNA 鎖を ³²P で2重標識したものを基質とし TAP 精製標品と反応させると、RNA 鎖を標識した ³²P の TCA 不溶画分はほとんど変化せず、メチル基を標識した ³H のレベルは反応後 30 分で 50% に達し、その後維持された(図2 - B)。このことから我々の得た TAP 精製標品はキャップ構造を除去するが RNA を分解しないという理想的な品質であることが確認された。このことは、cap site 解析を行う際に求められる高い解析精度を保証する上で非常に重要なポイントであることは言うまでもない。

rOligo 配列

Cap Site cDNATM を鋳型とした Cap Site PCR を特異性の高いものとするために、rOligo の配列については、解析対象の RNA 中にその配列の出現頻度が低くなくてはならない。我々は

10 塩基よりなる任意の 450 種類の配列を設定し、真核生物由来の約 700 万塩基対を対象にホモロジー検索を行いその出現頻度をホモログスコアで表した。そして出現頻度とこのスコアとの間に相関があるかどうかを調べるために、実際に 450 種類の配列を合成しヒトゲノム DNA を鋳型として RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 解析を行った。その結果スコアの高い配列は増幅量が多く(出現頻度が高い) スコアの低い配列は少ない(出現頻度が低い)という相関が見られた(図3 - A)。即ち、ホモログスコアの低い配列は特異性が高いことが証明された。以上の考察からスコアの低い 10mer を組み合わせた RC2+AA が rOligo として選ばれている。

この配列の特徴は T4 RNA リガーゼによるライゲーション効率を考慮して 3' 末端に AA をもつこと、そして rOligo の内部に複数のプライマーを設定し nested PCR が可能なように 38mer の長さをもつことである。これによって Cap Site PCR に高い特異性を与えるプライマー、1RC 及び 2RC を rOligo 内部に設定することができた(図3 - B)。

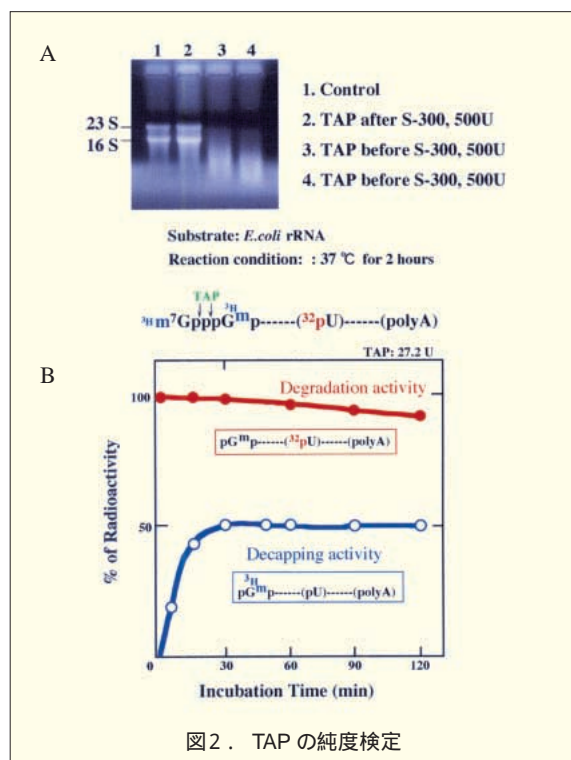


図2. TAP の純度検定

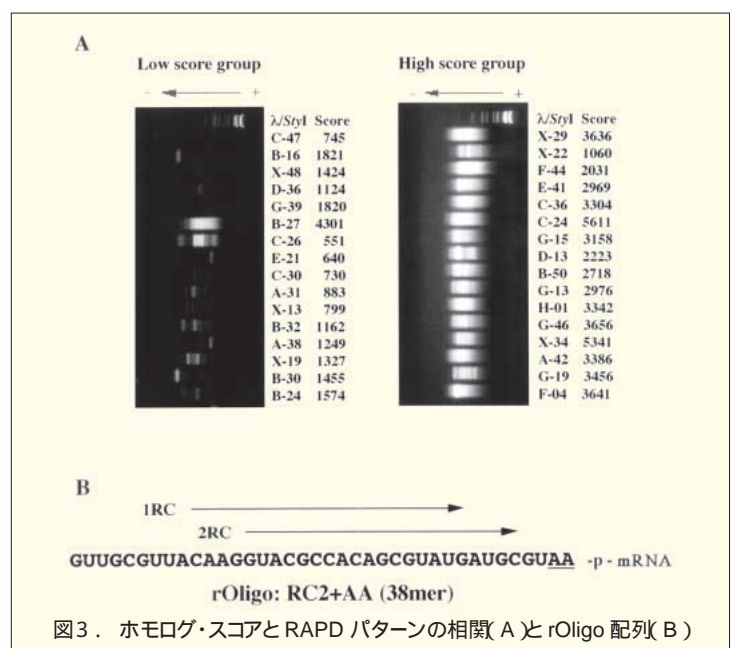


図3. ホモログ・スコアと RAPD パターンの相関 (A) と rOligo 配列 (B)

ヒト胎盤性ラクトゲン遺伝子 (hPL) によるモデル実験

このようにして得られた TAP と rOligo を用いてヒト胎盤由来 poly (A)+ RNA から Cap Site cDNA を作製し、すでに転写開始点が報告されているヒト胎盤性ラクトゲン遺伝子^{7,8)} をモデルとして、この遺伝子の cap site の同定を試みた。rOligo の内部に設定したセンス・プライマー、1RC、とヒト胎盤性ラクトゲン cDNA に特異的なアンチセンス・プライマー、ASP2、とを用いてヒト胎盤 Cap Site cDNA を鋳型として PCR を行った。ヒト胎盤ラクトゲン遺伝子の転写開始点から ASP2 プライマーまでの長さは約 600 bp であるが、Cap Site PCR の結果はまさにそのサイズに一致した (図 4 - A)。そして、この PCR 産物の塩基配列を解析した結果、報告のあったメジャー及びマイナーな転写開始点を同定することができた (図 4 - B)。このことから Cap Site cDNA™ は PCR を応用することにより、簡便・迅速かつ正確に転写開始点 (cap site) をクローニングする優れた試薬であることが示された。

遺伝子クローニングへの応用

我々はヒト遺伝子疾患の一つであるウエルナー症候群の原因遺伝子 (WRN) の転写調節領域 (プロモーター) を同定する目的で Cap Site PCR を行った。HeLa Poly (A)+ RNA から Cap Site cDNA™ を作製し、これを鋳型として PCR を行った。RC2+AA の内部に設定されたセンス・プライマー 1RC 及び 2RC とウエルナー遺伝子に特異的なアンチセンスプライマー ASP1 及び ASP2 を用い (図 5 - A)。まず 1RC と ASP1 で PCR を行い、次にこの 1st PCR 産物を鋳型として 2RC と ASP2 で 2nd PCR を行った。その結果 1 回目の PCR では DNA バ

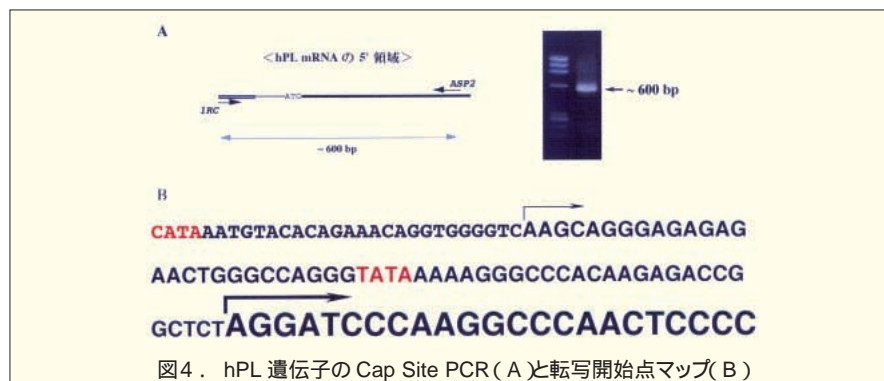


図 4. hPL 遺伝子の Cap Site PCR (A) と転写開始点マップ (B)

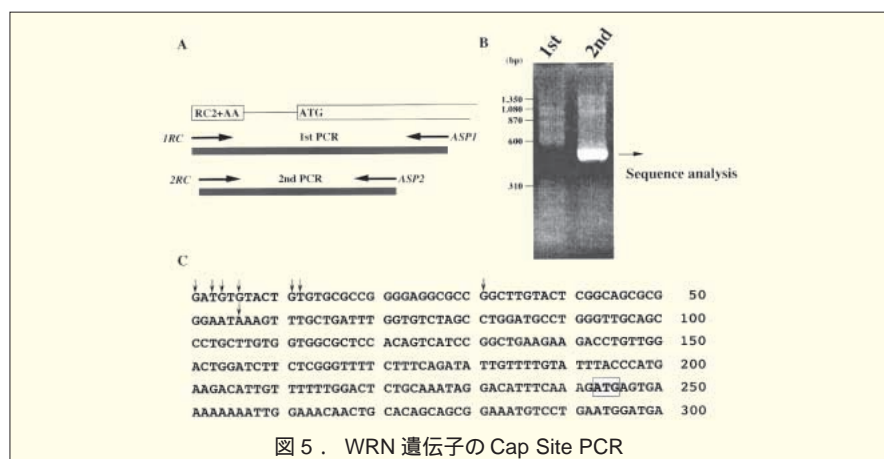


図 5. WRN 遺伝子の Cap Site PCR

ンドの増幅が検出されなかったが、この反応物を鋳型とする nested PCR を行うことにより特異的なバンドの増幅が得られた (図 5 - B)。そこで、このバンドを精製・サブクローニングの後、塩基配列を解析したところ図 5 - C に示すように複数の転写開始点が同定され、S1 mapping による WRN 遺伝子の転写開始点のデータと一致した⁹⁾。また WRN 遺伝子の Cap Site PCR によって同定された転写開始点を基にしてその 5' 上流領域を解析したところ、プロモーター活性を確認することができた⁹⁾。

おわりに

Cap Site cDNA™ はこれまで述べてきたように高純度 TAP の精製や特異性の高い rOligo のデザインなどの様々な検討を盛り込んだ mRNA の 5' 末端配列を決定する試薬である。従って、このキットはこれまでは煩雑・困難であった転写開始点の同定を塩基レ

ベルで解析できる優れたツールに仕上がっている。実際に我々は Cap Site cDNA™ を使って何種類もの新規遺伝子の転写開始点の同定に成功しており、プロモーター領域の解析や翻訳開始コドンの確認に威力を発揮している^{9,10,11,12)}。和光 / ニッポンジーンから発売された Cap Site cDNA™ は PCR クローニングの経験者全てに翻訳開始コドン・転写開始点を容易に同定する機会を与えてくれるものと確信する。さらにゲノム・サイエンス時代も後半に差しかかり、cDNA の 5' 領域の情報の必要性が高まるこの時期に、Cap Site cDNA™ の応用範囲はさらに広まるものと思われる。

〔参考文献〕

- 1) Maruyama, K., & Sugano, S (1994) Oligo-capping : a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. *Gene*, 138, 171-174.
- 2) Furuichi, Y., & Miura, K. (1975) A blocked structure at the 5' terminus of mRNA from cytoplasmic polyhedrosis virus. *Nature*, 253, 374-375.
- 3) Furuichi, Y., LaFiandra, A., & Shatkin, A. J.

(1977) 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature*, 266, 235-239.

4) Lewis, J. D., & Izaurralde, E. (1997) The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur J Biochem*, 247, 461-469.

5) McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S., & Bentley, D. L. (1997) 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxyterminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev*, 11, 3306-3318.

6) Shinshi, H., Miwa, M., Kato, K., Noguchi, M., Matsushima, T. & Sugimura, T. (1976) A novel phosphodiesterase from cultured tobacco cells. *Biochemistry*, 15, 2185-2190.

7) Chen, E. Y., Liao, Y.-C., Smith, D. H., Barrera-Saldane, H. A., Celinas, R. E. and Seeburg, P. H. (1989) The human growth hormone locus : Nucleotide sequence, biology, and evolution : *Genomics*, 4 (4) 479-497.

8) Tanaka, M., Masuda, N., Watahiki, M., Yamakawa, M., Shimizu, K., Nagai, J. and Nakashima, K. (1988) cDNA Cloning of human chorionic somatomammotropin-1 mRNA whose transcription was initiated at the 5' region of TATA box. *Biochem. Int.*, 16(2) 287-292.

9) Yamabe *et al* (1998) *Mol. Cell. Biol.*, submitted.

10) Shimamoto, A., Kitao, S., Ichikawa, K., Suzuki, N., Yamabe, Y., Imamura, O., Tokutake, Y., Satoh, M., Matsumoto, T., Kuromitsu, J., Kataoka, H., Sugawara, K., Sugawara, M., Sugimoto, M., Goto, M. & Furuichi, Y. A unique human gene that spans over 230 kb in the human chromosome 8p11-12 and codes multiple family proteins sharing RNA-binding motifs. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 10913-10917.

11) Yamabe, Y., Ichikawa, K., Sugawara, K., Imamura, O., Shimamoto, A., Suzuki, N., Tokutake, Y., Goto, M., Sugawara, M., & Furuichi, Y. (1997) Cloning and characterization of Rep-8 (D8S2298E) in the human chromosome 8p11.2-p12. *Genomics*, 39, 198-204.

12) Chang, A.C.M., Jeffrey, K.J., Tokutake, Y., Shimamoto, A., Neumann, A. A., Dunham, M.A., Cha, J., Sugawara, M., Furuichi, Y., & Reddel, R. R. (1998) Human stanniocalcin (STC): genomic structure, chromosomal localization, and the presence of CAG trinucleotide repeats. *Genomics*, 47, 393-398.

(株)ニッポンジーン Cap Site cDNA™

〔特長〕

調製済の cDNA なので、面倒な mRNA の精製や酵素反応等が不要です。
CapSite™ Hunting により、発現遺伝子の転写開始点が迅速、高感度しかも正確に決定できます。

あらかじめ cDNA として合成した Cap Site のライブラリーなので、複数の遺伝子が同時に解析できます。

キャップ構造をターゲットとした方法で調製しました。

〔保存〕 - 20

〔参考文献〕 Maruyama, K. and Sugano, S. : *Gene*, 138, 171-174(1994)

〔内容〕

Cap Site cDNA™	10 μ l
1RC Primer(10 μ M)	100 μ l
2RC Primer(10 μ M)	100 μ l
Control Primer1(10 μ M)	10 μ l
Control Primer2(10 μ M)	10 μ l
製品マニュアル	

Code No.	製品名	容量	希望納入価格(円)
311-03581	Cap Site cDNA™, Human Brain	1set	90,000
312-03631	Cap Site cDNA™, Human Heart	1set	90,000
319-03641	Cap Site cDNA™, Human Hippocampus	1set	90,000
313-03661	Cap Site cDNA™, Human Kidney	1set	90,000
318-03591	Cap Site cDNA™, Human Liver	1set	90,000
310-03431	Cap Site cDNA™, Human Placenta	1set	90,000
310-03671	Cap Site cDNA™, Human Spleen	1set	90,000
317-03441	Cap Site cDNA™, Human Testis	1set	90,000
317-03681	Cap Site cDNA™, Human Thymus	1set	90,000
314-03691	Cap Site cDNA™, Mouse Brain	1set	90,000
NEW 315-03741	Cap Site cDNA™, Mouse Embryo(16days)	1set	90,000
317-03701	Cap Site cDNA™, Mouse Heart	1set	90,000
311-03601	Cap Site cDNA™, Mouse Intestine	1set	90,000
314-03451	Cap Site cDNA™, Mouse Kidney	1set	90,000
318-03611	Cap Site cDNA™, Mouse Liver	1set	90,000
315-03621	Cap Site cDNA™, Mouse Lung	1set	90,000
314-03571	Cap Site cDNA™, Mouse Spleen	1set	90,000
311-03461	Cap Site cDNA™, Mouse Testis	1set	90,000
316-03651	Cap Site cDNA™, Mouse Thymus	1set	90,000
314-03711	Cap Site cDNA™, Rat Brain	1set	90,000
NEW 312-03751	Cap Site cDNA™, Rat Embryo (18days)	1set	90,000
NEW 319-03761	Cap Site cDNA™, Rat Kidney	1set	90,000
NEW 316-03771	Cap Site cDNA™, Rat Liver	1set	90,000
NEW 310-03791	Cap Site cDNA™, Rat Lung	1set	90,000
NEW 313-03801	Cap Site cDNA™, Rat Ovary	1set	90,000
NEW 310-03811	Cap Site cDNA™, Rat Pancreas	1set	90,000
NEW 317-03821	Cap Site cDNA™, Rat Skeletal Muscle	1set	90,000
NEW 314-03831	Cap Site cDNA™, Rat Small Intestine	1set	90,000
311-03721	Cap Site cDNA™, Rat Spleen	1set	90,000
NEW 311-03841	Cap Site cDNA™, Rat Stomach	1set	90,000
NEW 313-03781	Cap Site cDNA™, Rat Testis	1set	90,000
318-03731	Cap Site cDNA™, Rat Thymus	1set	90,000
318-03471	Cap Site cDNA™, Rice Shoot(L16D8 *1)	1set	90,000
315-03481	Cap Site cDNA™, Rice Shoot(Dark *2)	1set	90,000

* 1 L16D8 : for 7days in 16hr. light and 8hr. darkness per day
* 2 Dark : for 7days in complete darkness

本製品は、株式会社エイジーン研究所が開発し、株式会社ニッポンジーンが製造したものです。

30分で全血中の DNA が抽出可能!!

DNA Extractor WB-Rapid Kit

現在 PCR 反応をはじめとする各種の検出法が開発され、ヒトゲノム DNA を用いた研究や診断が特別な技術や経験を必要とせずに一般に行えるようになってきました。このような状況の中で、ヒトゲノム DNA を抽出する頻度が増し、簡便かつ短時間でゲノム DNA を抽出できるキットが要望されています。

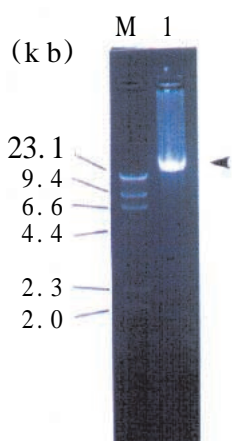
DNA エキストラクター WB- ラピッドキットは、全血液からのゲノム DNA 抽出を短時間(30分)にかつ、高回収率で抽出でき、少量多検体処理に有効です。

特長

1. 簡便な操作(1本の反応容器)により30分でゲノム DNA を抽出することができます。
2. EDTA 血及び、使用する鋳型 DNA 量の調節によりヘパリン血でも PCR 反応を阻害しない DNA サンプルが抽出できます。
3. 凍結保存血からも DNA が回収できます。
4. 少量多検体処理に有効です。
5. フェノール、クロロホルムなどの有害な有機溶剤を使用しません。

実用例

(ゲノム DNA の確認)

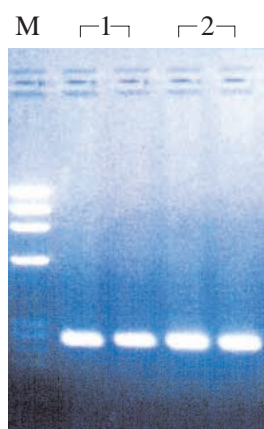


ヒト全血 100 μ l から操作法に従ってゲノム DNA を抽出後、1.0% アガロースゲル電気泳動を行った。

分子量マーカー 23.1kb のバンドよりも大きい位置に1バンドとして高分子量ゲノム DNA が検出された。

M: λ Hind 分子量マーカー
1: ゲノム DNA

(ヘパリンの影響)



操作法に従って抽出したゲノム DNA の全血 5 ~ 10 μ l に相当する量をテンプレートとして PCR 反応を行った。

全血 5 μ l、10 μ l 分の DNA を鋳型に用いた PCR 反応で、ヒト α -Globin 領域の 262bp の増幅を確認した。

M: ϕ x174 Hae 分子量マーカー
1: 全血 5 μ l に相当する DNA
2: 全血 10 μ l に相当する DNA

(他社との比較)

	Kit	DNA 収量	A/WB-Rapid
サンプル 1	WB-Rapid	4.92 μ g	25.5%
	A 社	1.27 μ g	
サンプル 2	WB-Rapid	2.73 μ g	9.6%
	A 社	0.26 μ g	

サンプル 1: EDTA 処理し 4 日で 10 日保存した血液
サンプル 2: ヘパリン処理し 4 日で 10 日保存した血液

[参考文献]

Lu, W., Hirayasu, K., Ishizawa, M. and Kobayashi, Y. : *Nucleic Acids Res.*, 22, 1774(1994).

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
297-54801	DNA エキストラクター WB- ラピッド キット	全血中 DNA 抽出用	20 回用	9,500
293-54803			200 回用	20,000

(株)ニッポンジーン

Drop PCR Kit for Human Blood

血液中には、多くのPCR阻害物質が含まれています。血液中のDNAを解析するためには、従来はDNAをあらかじめ精製しなければなりません。

Drop PCR Kit for Human Bloodには、これらの阻害物質の作用を効果的に抑制する物質を含むBufferが添付されており、各種抗凝固剤処理血、凝固血及び血痕を直接PCR反応液に添加するだけでPCRを行うことができます。

また、Gene Taq、dNTP Mixtureが添付されていますので、血液試料及びプライマーを用意するだけで目的の遺伝子の増幅が可能です。なお、Gene Taqは、本品の性能を最大限に発揮させることのできるTaq DNA Polymeraseです。

〔特長〕

- 血液を直接PCR反応液に添加するだけでPCRを行えます。
 - 各種抗凝固剤処理血、凝固血及び血痕試料に使用できます。
 - 1kbp以下のDNAの増幅に適しています。
 - DNA精製を行う必要がないので、
 - ・短時間で解析できます。
 - ・操作が簡便であり、一度に多数のサンプルを処理することができます。
 - ・精製過程におけるクロスコンタミネーションの可能性が少なくなります。
 - ・ウイルス感染血などを扱う際の危険性が少なくなります。
- 詳細なマニュアルが添付されています。

〔内容〕

Drop A	600 μ l
Drop B	600 μ l
Gene Taq	150units
dNTP Mixture	240 μ l
Control Primer	15 μ l
(forward and reverse, 20pmol/ μ l each)	
Loading Buffer(-SDS)	300 μ l

〔保存〕 - 20

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
318-03851	Drop PCR Kit for Human Blood	60回分	55,000

Drop PCR Kit for Human Bloodは株式会社島津製作所との技術提携で製品化しました。

Protein Molecular Weight Markers, Low-Range (M.W. 3,500 ~ 31,000)

電気泳動用

SDS、還元剤、グリセロールを含むローディング緩衝液に溶解されていますので直ちに使用できます。

Protein	M.W.
Carbonic anhydrase	31,000
Soybean trypsin inhibitor	20,400/19,700
Horse heart myoglobin	16,900
Lysozyme	14,400
Aprotinin	6,100
Insulin, β chain	3,500
各濃度 0.5mg/ml	

性状: 62.55mmol/l Tris-HCl (pH 6.8)、
2% SDS、10mmol/l DTT、20%
Glycerol、0.0125% Bromophenol
Blue

SDS-PAGEのGel濃度:

16% (32:1 Acrylamide : Bis)

163-18511 1ml 27,000円

〔関連商品〕

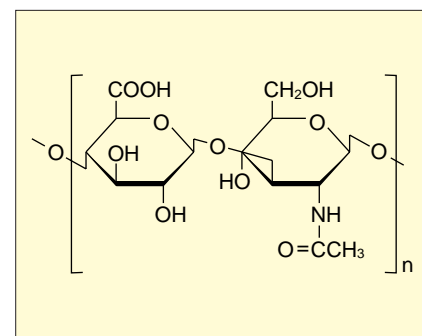
Protein Molecular Weight Markers,
Mid-Range (M.W. 97,400~14,400)
電気泳動用

169-16911 1ml 21,000円

Hyaluronic Acid Potassium Salt from Human umbilical cords

ヒトへその緒から分離した β -D-N-アセチルグルコサミンと β -D-グルクロン酸が交互に結合してできた直鎖状の高分子多糖です。ヒアルロニダーゼの基質としてヒアルロニダーゼの生理活性その他異化代謝の研究に有用です。

549-00203 100mg 9,000円



第32話 エンドトキシンとサイトカイン

エンドトキシンは種々の生物活性を示します。これらの活性は、細胞への直接作用及びその結果産生される液性因子によって起こると考えられます¹⁾。エンドトキシンによって産生される液性因子としては、インターロイキン(IL)-1、IL-6、IL-8、腫瘍壊死因子(TNF)、インターフェロン(IFN)などのサイトカインや血小板活性化因子(PAF)、アラキドン酸カスケード因子などのケミカルメディエーター組織因子(TF)などが挙げられます。今回は、この中から、炎症性のサイトカインについてエンドトキシンとの関係を考えてみたいと思います。

発熱性は、エンドトキシンの代表的な生物活性です。その機構は、エンドトキシンの作用により各種細胞より産生されたIL-1、IL-6、TNF、IFNなどが視床下部に作用してプロスタグランジンE₂を産生させて発熱を起こすと考えられています。人に対するエンドトキシン(*E. coli* O113:H10:K-株 LPS 2 ng/kg)の投与実験では、投与後1.5時間でTNFの、2時間でIL-6のピークが認められ、体温は徐々に上昇し、投与後3時間目あたりをピークとした発熱がサイトカインが下がった後も続くという結果が報告されていま

す²⁾。その他多くの生物活性も実はサイトカインの作用によって起こっていることがわかってきています。

この中で、エンドトキシンが単球や顆粒球を活性化する機序については、最近の10年間で非常に研究が進んだ分野の一つといえるでしょう。この研究の進歩に大きく貢献したのが、急性期蛋白であるLPS結合蛋白(LBP)の発見です³⁾。この60kDaの糖蛋白の血清中の濃度は、正常人では0.5μg/ml以下ですが、炎症の急性期には30μg/ml以上になるといわれています。LBPはエンドトキシンのリポD部分に結合し、LBP存在下におけるマクロファージのTNF産生は、非存在下でのエンドトキシン濃度以下で起こることが報告されています。さらに、マクロファージの分化抗原の一つであるCD14がLPS-LBP複合体のレセプターであることが明らかにされ⁵⁾、LBPがエンドトキシンのCD14との結合を大幅に促進することが示されました。マクロファージに対するエンドトキシンの作用はこのLBP・CD14を介した系が中心と思われませんが、エンドトキシンが直接CD14に結合する系やCD14をも介さない系があるといわれています。ともあれ、マクロファージに

結合したエンドトキシンがTNFをはじめとするサイトカインの誘導の引き金となるわけですが、その結合様式には種々のパターンがあるようです。

サイトカインは、もともと生体によって制御されており、生体にとって必要なものと考えられます。しかし、腫瘍を壊死させる因子として発見されたTNF

が、実は悪液質誘発因子として発見されたカケクチンと同一の物質であった例からもわかるように、制御されない状態のサイトカインは、生体にとって非常に危険な作用を及ぼす可能性があります。エンドトキシンの悪玉としての作用の発現において、エンドトキシンがマクロファージ、好中球、血管内皮細胞等に作用し、生体のサイトカインネットワークをかき乱すことがかなり重要と考えられます。また、逆の観点から、腸内細菌のエンドトキシンやペプチドグリカンが生体内ではホルモンのような作用をしているという考えもあり¹⁾、非常に興味深いところです。

ともあれ、エンドトキシンに結合する血漿中の蛋白は多数報告されていますし、生体への作用機序も非常に複雑です。さらに、これまでのシリーズで考えてきたように、エンドトキシンの活性自体が変化しやすいもので、このこともエンドトキシンの生体作用を複雑にしていると思われるかもしれません。いずれにしても、エンドトキシンの生体作用にとってサイトカインは最も重要な因子の一つと考えられますが、その全貌は依然として明らかにはなっていません。

〔参考文献〕

- 1) 遠藤重厚、稲田捷也:「エンドトキシンと病体」, p.41-74, (へるす出版)(1995)
- 2) Van Deventer, S. J. *et al.*: *Blood*, 76, 2520-2526(1990)
- 3) Tobias, P. S. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, 263, 13479-13481(1988)
- 4) Mathison, J. C. *et al.*: *J. Immunol.*, 149, 200-206(1992)
- 5) Wright, S. D.: *Science*, 249, 1431-1432(1990)

今回は「第33話 エンドトキシンの測定条件」の予定です。



パイロセップを用いた濃縮により 試料中の微量エンドトキシンを特異的に測定 脂溶性中の微量エンドトキシンの測定も可能

Limulus PS Single Test wako

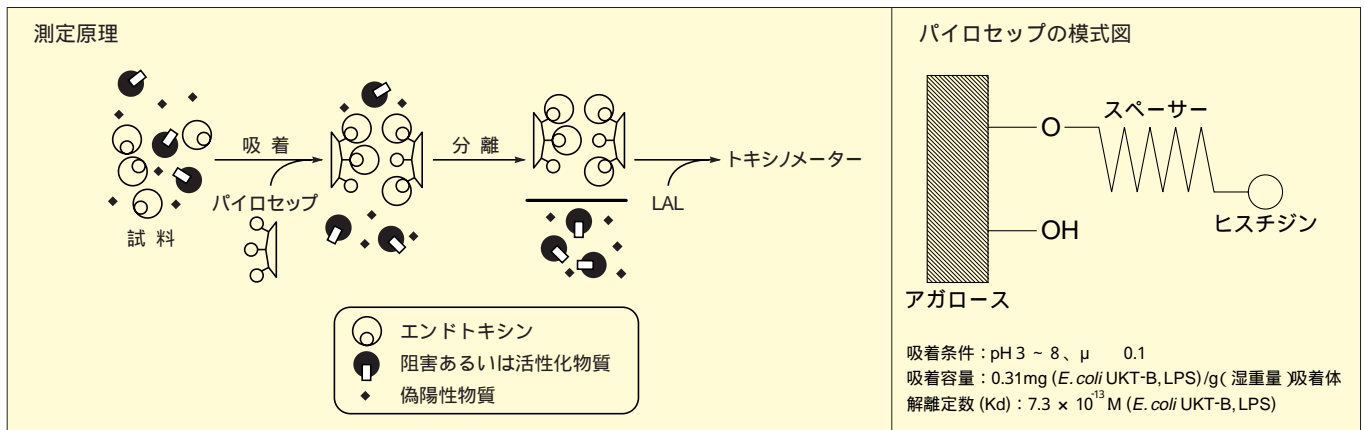
エンドトキシンに特異的なLAL ES 試薬と、エンドトキシン吸着剤である Pyrosep(パイロセップ)から成るキットです。試料中のエンドトキシンをパイロセップに吸着・濃縮させた後エンドトキシンに特異的なLAL ES 試薬と反応させ、比濁時間分析法により試料中のエンドトキシンを定量します。通常のリムルステストでは検出不可能な、ごく微量のエンドトキシンや脂溶性物質中のエンドトキシンの検出に有効です。

特長

パイロセップにより試料中のエンドトキシンを吸着させ濃縮しますので、共存物質の影響を受けずに微量のエンドトキシンを特異的に測定することが可能です。
エンドトキシンはエタノール中でもパイロセップに吸着するため、通常のリムルステストでは不可能な脂溶性試料でもエタノールで溶解できればエンドトキシンの測定が可能です。
測定に必要な数だけLAL 試薬を使用できますので無駄がありません。

測定原理

パイロセップ(水溶性担体にスパーサーを介してヒスチジンを結合させたアフィニティー吸着体で、エンドトキシンを特異的に吸着させる(田辺製薬(株)開発))を充てんしたキャピラリーカラムに、試料中のエンドトキシンを吸着させます。試料を洗い流した後、吸着したエンドトキシンをLAL 試薬と反応させることによって、試料中のエンドトキシンの定量を行います。測定はトキシノメーターで行います。



内容

- | | |
|---|------------------|
| (1) LAL ES 試薬 米国カプトガニ(Limulus polyphemus)血球抽出物の凍結乾燥品
(トリス塩酸緩衝液、β-1,3-グルカン誘導体を含む) | 20 バイアル(0.3ml 用) |
| (2) パイロセップ懸濁液(リン酸緩衝液に懸濁) | 20 バイアル(0.77ml) |
| (3) LAL 溶解液 | 1 バイアル(7ml) |
| (4) 洗浄液 | 4 バイアル(11ml) |
| (5) 検体希釈用緩衝液 | 4 バイアル(10ml) |
| (6) キャピラリー(シリコンチューブ付き) | 20 本 |

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
299-54501	Limulus PS Single Test wako	エンドトキシン検出用	20 回用	98,000

第3話 アポトーシスの検出法— DNA 断片化の解析法

1972年、Kerr、Wyllie、Currieらによりそれまで一般的であった受動的な細胞死、ネクローシスとはことなる細胞死の様式として能動的な細胞死、アポトーシスが提唱された¹⁾。彼らの定義によるとアポトーシスは細胞表面微絨毛の消失、細胞体積の縮小、クロマチン DNA の核膜周辺への凝縮、核の断片化といった形態学的変化、及びクロマチン DNA のヌクレオソーム単位での断片化といった生化学的变化を伴う細胞死であるとされている。ここ数年のあいだにアポトーシスに関する研究は爆発的に進み、分子レベルにおけるアポトーシスのメカニズムの解析が世界中で行われている。研究の進展に伴い、poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)の分解などの新たなアポトーシスマーカーが用いられるようになってきたが、現在でもDNA断片化の解析はアポトーシス研究におけるはじめの一歩であるとともに、その細胞死が真にアポトーシスによるものであるかを判定する上で重要な位置を占めている。しかしDNA断片化を迅速かつ定量的に観察する手法は細胞、組織により異なり、一部の接着細胞、ガン組織などにおいてはきれいなラダー像を得ることが困難である場合も少なくない。また、アポトーシスのDNA切断にはラダー状のDNA断片化とは別に数十～数百キログラム塩基対といった大きなDNA切断、いわゆるラージフラグメンテーションが存在することが報告されており、このラージフラグメンテーションをアポトーシスの指標に用いる論文もみられるようになってきた。さらにDNA切断を触媒するエンドヌクレアーゼとしてDNase I型(3'-OH/5'-P またDNase II型 3'-P/5'-OH)の切断様式を持つ酵素の関与が示唆されており²⁻⁵⁾、それぞれの系においてどのようなエンドヌクレアーゼが働いているかを調べるには断片化DNAの切断様式を決定する必要があるなど、しだいにアポトーシス細胞のDNA解析においても様々なテクニックが要

求されるようになりつつある。

1. アポトーシスにおける DNA 切断

真核生物のゲノム DNA はクロマチンと呼ばれる形態をとっており、ヒストン八量体に DNA が約 1 と 3/4 回巻ついたコアとそれを結ぶリンカー部位にヒストン H1 が結合したヌクレオソームを基本的な単位構造としている(図 1A)。アポトーシスにおいてはこのリンカー部位に切断が起こるため、アポトーシスを起こした細胞から DNA を抽出しアガロースゲル電気泳動法を用いて解析するとその泳動像は図 1B に示すような約 180 塩基対の整数倍の DNA ラダーが観察される。これが現在アポトーシスを判定する指標としてもちいられている DNA 断片化である。さて実際にはどの様にこの DNA ラダーを観察すればよいのだろうか。

2. アガロースゲルを用いた DNA 切断解析法

アガロースゲル電気泳動法により DNA ラダーを観察する行程は、1、粗 DNA 溶液の調整、2、DNA の抽出、3、アガロースゲル電気泳動、の3つのステップに分けることができる。HL-60 や Jurkat、L929 などの培養細胞やラット胸腺細胞など、多くの細胞についてステップ 2 を省略し良好な結果を得ている。しかし一部の上皮系培養細胞や組織細胞においては DNA の抽出を行わないときれいな泳動像が得られないこともある。私達は抽出過程に

おける DNA の損失がなく、その後の定量化においてより信頼性が高まること、また、より簡便、迅速であることから通常 1、3 の組み合わせにより実験を行っている。実際に実験を行うときはまず 1、3 の組み合わせをためし、うまくいかない場合は 1、2、3 の組み合わせを行うのが良いであろう。

粗 DNA 溶液の調整は以下のように行う。培養細胞の場合、約 1×10^6 個の細胞を $20 \mu\text{l}$ の lysis buffer (50mM Tris-HCl pH7.8, 10mM EDTA, 0.5% w/v sodium-N-lauroylsarcosinate) に懸濁した後、RNase A、及び Proteinase K 処理を行う。また、ガン組織などの場合はガラス板などの上で細かく切り刻み、その一部 ($1 \mu\text{l}$ 程度) でよい、概ね数 μg の DNA がとれる) に $20 \mu\text{l}$ の lysis buffer を加え、Proteinase K、RNase A の順で処理を行うことで良い結果が得られる。

このようにして得られた DNA をアガロースゲル電気泳動法を用いて解析するのだが、ミュージッドシステムを用いる場合、ウェルには最大 $30 \mu\text{l}$ のサンプルがアプラインできるので、DNA 溶液の全量をのせることができる。しかし、ここで得られた DNA サンプルは粘度が高く、通常の方法でゲルにアプラインしてもすべて泳動バッファー中に浮き出してしまふ。そこで私たちはまずサンプルをゲルにアプラインしてから泳動バッファーをゲルの上端ぎりぎりまで満たし泳動を開始し、マーカー色素が 1mm ほどゲルに入っ

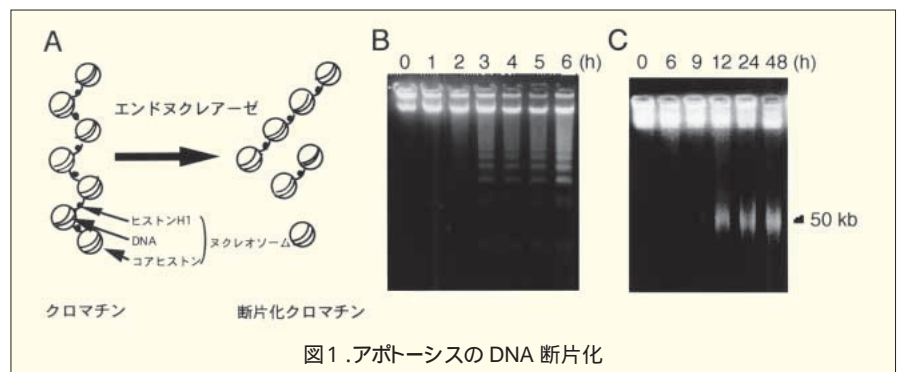


図1 .アポトーシスの DNA 断片化

たらゲルを沈め、さらに泳動を行うという方法を行っている。DNA ラダーを観察する場合は2%のゲルを用い図1Bのような泳動像が得られる。きれいな泳動像が得られない場合はステップ2のDNAの抽出を行なった後に泳動を行なうが、この場合は加える lysis bufferを100~500 μ lにスケールアップしてDNA溶液を調整し、フェノール/クロロフォルム抽出、及びエタノール沈殿を行った後、TEバッファーにとかせば良い。なお、加える Proteinase Kの量、処理時間を増やすことでもかなり改善できる。最近、より少ない細胞数(1 \times 10⁴個程度)を用いて簡便にラダーを検出できるキットが和光より発売されているので、初めてラダーを観察する場合、また従来法の検出感度に不満がある場合には試してみると良いであろう。

このように行ったアガロースゲルのポラロイド写真をもとに、DNA断片化率を定量することもできる。まず写真をイメージスキャナで取り込みコンピュータを用いて画像解析を行うのだが、DNA量をODで表し総DNA量に対するある大きさ以下(5kbpを基準としている)のDNA量の比をもってDNA断片化率としているので、デンストメータ機能のあるものであれば利用可能である。

ラージフラグメンテーションを観察する場合にはパルスフィールド電気泳動法を用いれば良い。私達は電場の向きを180°交互に変換させるFIGE(field inversion gel electrophoresis)を行っている、結果の一例を図1Cに示した。

3. DNA 切断様式の解析法

酵素的な切断をうけたDNAの末端は3'-OH/5'-P、または3'-P/5'OHであることが考えられる。よって、さまざまな細胞のアポトーシスにおいて断片化されたDNAフラグメントの切断様式

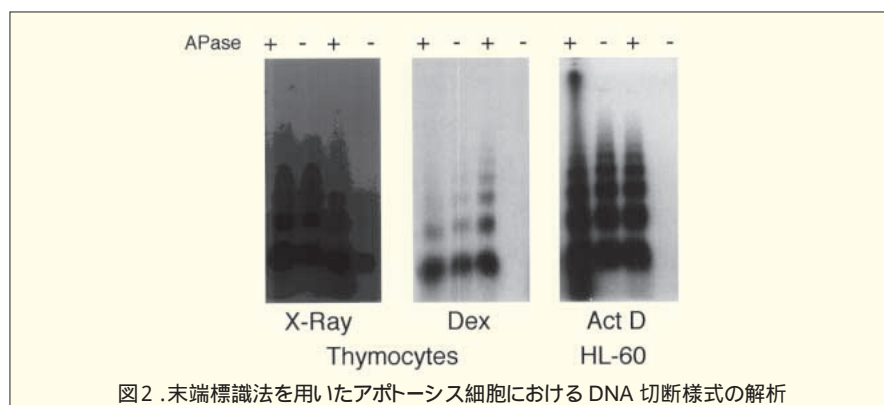


図2. 末端標識法を用いたアポトーシス細胞におけるDNA切断様式の解析

を調べることは、それぞれの細胞においてどのようなエンドヌクレアーゼがDNA断片化に関与しているのを知る上で重要である。私達は、基質となるDNAの末端がOHの場合にのみ働くという酵素の特性を利用した切断様式決定法を行っている。

DNAラダーの検出法で述べたステップ1、及び2を用いて(DNA抽出を行って)DNAサンプルを調製する。4サンプル分用意し、うち2サンプルをCIAP(仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼ)処理により末端リン酸基をはずし、3'および5'末端標識反応におけるポジティブコントロールとして用いる。

まず、CIAP処理、未処理のサンプルをペアとし、3'末端をターミナルヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)と[α -³²P]dCTP、5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼと[γ -³²P]dATPを用い、それぞれ標識を行う。フェノール/クロロフォルム抽出、クロロフォルム抽出後、エタノール沈殿によりDNAを回収し、アガロースゲル電気泳動を行う。ここではトランスファーの効率を考慮し、1.5%のTAEゲルを用いている。DNAをナイロン膜にトランスファーした後オートラジオグラフィを行うと図2に示す様な結果が得られる。そのラベリングパターンより、ここで調べたアポトーシス

細胞のDNA切断様式はすべて3'-OH/5'-P型であることがわかる。

アポトーシスに関する研究が進むにつれ、さまざまな刺激に反応して細胞がアポトーシスを起こすことが明らかとなってきた。しかし、形態学的変化やDNA断片化を観察せずに“アポトーシスである”と結論している論文もあり、それらのすべてがアポトーシスによる細胞死であるとは言い切れないように思われる。将来、細胞死の研究がさらに進み、生理的な細胞死がさらに細かく分類される日が来るであろう。そういった意味でも基本に立ち返り、形態学的変化、そしてDNA断片化をきちんと観察してゆくことがアポトーシス研究に求められているのではないか。

[参考文献]

- 1) Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) Br. J. Cancer 26, 239-257
- 2) Barry, A. and Eastman, A. (1993) Arch. Biochem. Biophys. 300, 440-450
- 3) Peitsch, M. C., Polzar, B., Stepham, H., Crompton, T., MacDonald, H. R., Mannherz, H. G. and Tshopp, J. (1993) EMBO J. 12, 371-377
- 4) Shiokawa, D., Ohyama, H., Yamada, T., Takahashi, K. and Tanuma, S. (1994) Eur. J. Biochem. 226, 23-30
- 5) Shiokawa, D., Ohyama, H., Yamada, T. and Tanuma, S. (1997) Biochem. J. 326, 675-681.

関連商品

蛍光法による高感度アポトーシス DNA ラダー簡易検出キット 24 レーン用 包装追加しました

主要な試薬をキット化していますのでプロトコールに従って使用するだけでアポトーシスが検出できます。

NEW

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
291-53204	Apoptosis Ladder Detection Kit <small>Wako</small>	アポトーシス研究用	24 レーン用	33,000
297-53201			96 レーン用	58,000

アルツハイマー病研究用

Anti Presenilin-1(N-terminus), Goat

免疫化学用

早期発症型家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として発見されたプレセニン-1及び-2は、その変異によりβアミロイド(Aβ)1-42/43の産生を亢進することが分かってきました。アルツハイマー病の発症メカニズムの研究にご利用下さい。

免疫原 : プレセニン-1のアミノ酸14-33に相当する合成ペプチド
 形状 : PBS凍結品
 特異性 : プレセニン-1のN末端残基14-33に特異的に反応する

実用希釈倍数 :
 ELISA 1:5,000
 免疫組織染色
 パラフィン切片 1:100
 凍結切片 1:1,000
 013-17321 1mg 50,000円

パラフィン切片染色用

~ Fas、Fas-L 抗体 ~

本品は、従来良好な結果が得られなかったパラフィン包埋切片での免疫組織染色に優れております。既に販売しております抗ヒトFas抗体とともに組織レベルでのFas及びFasリガンドの発現、局在の研究にご利用下さい。

Anti Mouse Fas, Rabbit

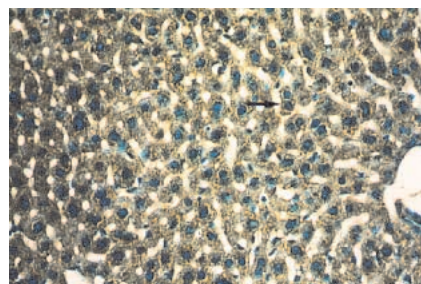
免疫化学用

免疫原 : マウスFasのアミノ酸292-306に相当する合成ペプチド-MAP

形状 : 全血清

特異性 : マウス肝臓の肝細胞細胞膜及び卵巣の顆粒層細胞、卵細胞に発現しているFasと反応する

実用希釈倍数 :
 パラフィン切片 1:100-1:500



抗マウスFas, ウサギによるマウス肝臓の免疫組織染色

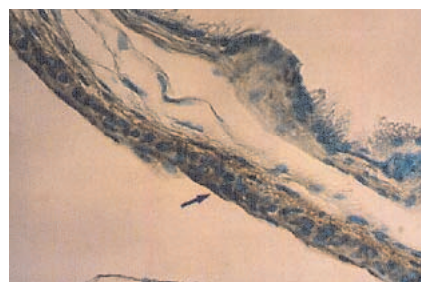
Anti Rat Fas Ligand, Rabbit

免疫化学用

免疫原 : ラットFasリガンドのアミノ酸42-56に相当する合成ペプチド-MAP

特異性 : マウス角膜の角膜上皮及び精巣の間質細胞に発現しているFasリガンドと反応する

実用希釈倍数 :
 パラフィン切片 1:100-1:1,000



抗ラットFas, リガンド, ウサギによるマウス角膜の免疫組織染色

コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
015-17261	Anti Mouse Fas, Rabbit	100μl	30,000
012-17271	Anti Rat Fas Ligand, Rabbit	100μl	30,000

[関連商品]

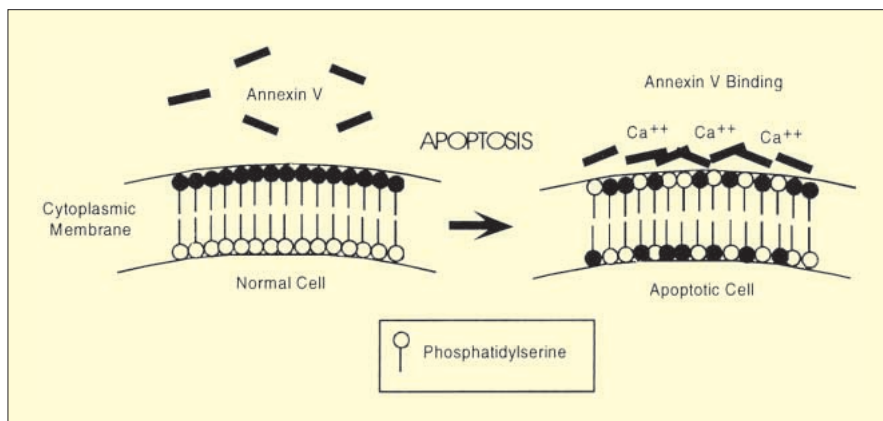
コードNo.	品名	容量	希望納入価格(円)
019-16181	Anti Human Fas, Rabbit	100μl	35,000

初期アポトーシスの検出に！

genzyme DIAGNOSTICS アネキシン V キット

- フローサイトメトリーにより 初期アポトーシスを検出 -

細胞膜りん脂質のホスファチジルセリンは、正常細胞では細胞質側にのみ存在しますが、アポトーシスの初期段階でこの非対称性が崩れ、ホスファチジルセリンが細胞表面に露出します。この変化はDNA断片化に先立って現れるため、初期のアポトーシスの指標となります。アネキシン V はカルシウムイオン存在下でホスファチジルセリンと特異的に結合し、初期アポトーシス細胞を検出します。



特長

- ・3ステップのシンプルなキットです。

検出方法:

細胞の採取、洗浄

アネキシン V、よう化プロピジウムとのインキュベーション

フローサイトメトリーによる測定

- ・フローサイトメトリーにより初期アポトーシスを検出します。
- ・蛍光顕微鏡による in situ apoptosis 検出もできます。
- ・よう化プロピジウムとの多重染色により初期アポトーシス細胞、後期アポトーシス細胞またはネクローシス細胞、生細胞の判別が可能です。

染色結果	アネキシン V	よう化プロピジウム
初期アポトーシス細胞	+	-
後期アポトーシス細胞 またはネクローシス細胞	+	+
生細胞	-	-

キット内容

- ・アネキシン V-FITC または Biotin 溶液 (50 μ g/ml) 100 μ l
- ・10 × Binding Buffer 5ml
- ・よう化プロピジウム溶液 (50 μ g/ml) 1ml

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
532-68111	80-4618-00	Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit	100 回用	41,000
539-68121	80-4619-00	Annexin V-Biotin Apoptosis Detection Kit	100 回用	41,000

関連商品

DNA 断片化の検出に！

コード No.	メーカーコード	品名	容量	希望納入価格 (円)
536-68131	80-4630-00	TACS™ Apoptotic DNA Laddering Kit-Etidium Bromide	20 サンプル用	27,000

関連試薬もございます。お問い合わせ下さい。

インスリン依存型糖尿病における遺伝的背景および液性免疫の意義

近畿大学 医学部 第2内科 今村 稔、青木 矩彦

今回は、IDDM (インスリン依存型糖尿病) のモデル動物の NOD マウスの糖尿病発症における細胞性免疫とリわけサイトカインの関与を述べた。NOD マウスは生後4週頃より膵島炎が生じ、その後自己免疫機序によりラ氏島の破壊が生じ、15週頃より自然発症的にIDDMが認められるようになる。その発症の遺伝的背景として、少なくとも10個の遺伝子が関与するとされる。その一つは、主要組織適合抗原 major histocompatibility (MHC、マウスでは H-2, ヒトでは HLA) クラス II 分子に関連したものである¹⁾。マウスのクラス II 分子には I-A (ヒトの HLA-DQ に相当) と I-E (ヒトの HLA-DR に相当) があり、NOD マウスにおいては、ユニークな I-A の存在 (鎖 57 番目のアミノ酸がセリンでありアスパラギン酸でないこと、また、56 番目がヒスチジンであることを指す) と I-E の欠如の両方が、膵島炎ならびに IDDM 発症に関与しているとされる。

一方、ヒトの IDDM の遺伝的背景については、一卵性双生児における IDDM の一致率が約 40% であることから、遺伝関与が示唆されている。関与する遺伝子として、NOD マウスと同様に、MHC クラス II 分子の重要性が指摘されている。われわれも一部症例についてクラス II 分子の HLA typing を検討したが、DR4 が 13 名中 9 名、DR9 は 13 名中 4 名に認められ、以前の報告と一致して、日本人 IDDM において DR4 と DR9 が高頻度に認められた (表)。また、DQ に関しては、IDDM と DQA1*03、DQB1*0303、DQB1*0401 と関連があるとされる²⁾。これら IDDM の疾患感受性遺伝子あるいは免疫応答遺伝子を検討すること

IDDM (18 例) の HLA typing と自己抗体陽性率

年齢 16 - 35 歳 (平均 27.5 ± 5.1 歳)

発症年齢 10 - 27 歳 (平均 20.0 ± 5.1 歳)

罹病期間 1 カ月 - 18 年 (平均 7.3 ± 4.7 年)

HLA typing

HLA DR4 9/13 (69.2%)

HLA DR9 4/13 (30.8%)

自己抗体陽性率

GAD 抗体陽性率 10/18 (55.6%)

ICA 陽性率 2/8 (25%)

は、その発症予防に関しても重要な意義を有するものと考えられる。

IDDM では、抗ラ氏島抗体 (ICA、ICSA) や GAD 抗体等のラ氏島に対する自己抗体が検出され、液性免疫も臨床あるいは病態上で重要な役割をはたす³⁾。現在もっとも臨床的に有用であるのは、GAD 抗体で保険適応もされている。発症早期 IDDM の 60-80% に検出され、さらに、IDDM の発症前より検出されるという特徴がある。当科では、GAD 抗体を IDDM と疑われるものに測定し診断の一助としている。実際に、GAD 抗体は IDDM と診断した患者の 55.8% で検出された。一方、ICA は、25% の陽性率であった (表)。また、インスリン非依存型糖尿病 (NIDDM) として治療している患者

の中にも緩やかに進行する IDDM (slowly progress IDDM) と考えられる症例が存在する。これら患者は NIDDM の時期でも GAD 抗体が陽性であり、その後インスリン依存性の状態になるので、IDDM の診断・予知マーカーとして有用である。さらに、現在、遺伝的背景や自己抗体の検出を考慮して IDDM の危険性が高い例 (ハイリスク者) をとりあげて IDDM の予防的治療も試みられているので³⁾、今後、免疫遺伝学ならびに自己抗体の重要性は拡大すると考えられる。

〔参考文献〕

- 1) Todd J. et al: Nature, 351, 542 (1991)
- 2) Awata T, Kanazawa Y: Diab Res Clin Pract, 24 (supple), S83 (1996)
- 3) Slover RH, Eisenbarth GS: Endocrine Reviews, 18, 241 (1997)

Stem Cell Factor, Mouse, recombinant

生化学用

Stem Cell Factor は、幹細胞のみならず血球細胞系、肥満細胞、生殖細胞、メラノサイト等の増殖・発達促進作用を有する多機能因子として知られており、遺伝的造血障害マウスの研究により c-kit のリガンドとしてクローニング

されました。

他のサイトカイン(IL-1, -3, -6)や造血因子(GM-CSF や G-CSF, EPO)などと相乗的に増殖作用を示すことが知られていますが、単独での作用は明らかとせず、ごく幼若な造血幹細胞に

作用していると予想されています。

〔形 状〕 凍結乾燥品(安定剤不含)

〔分子量〕 18.3kDa

198-11521 10 μ g 39,000 円

血球染色試薬

ギムザ染色液

〔染色法〕

- | | |
|---|--------------------------------------|
| ①固 定：メタノール数滴..... 約 30 秒 | ③染 色：希釈した染色液を塗抹面にのせる。..... 15 ~ 30 分 |
| ②染色液希釈：水 1ml に対し 1 ~ 1.5 滴ギムザ染色液を添加する。
(標本 1 枚あたり 2 ~ 3ml の希釈染色液が必要) | ④洗 浄：水洗..... 15 ~ 30 秒 |
| | ⑤乾 燥 |

* 注意 * ギムザ染色液は一旦希釈すると時間の経過に伴いアズール B とエオジン Y が結合し、染色性が悪くなるので、用時希釈して下さい。

メイグリュンワルド染色液

〔細胞診染色法〕

- ①前処理：1. メイグリュンワルド染色液を塗抹標本上に載せる
2. 蒸留水またはりん酸緩衝液 (pH 6.4 ~ 6.8 1/15 mol/l) をさらに加える
- ②洗 浄：流水..... 30 秒 ~ 1 分
- ③染 色：ギムザ希釈液..... 15 分 ~ 20 分
- ④洗 浄：水洗..... 数秒
- ⑤後処理：水を塗抹面に盛る
(青色の液が浮き出る)..... 30 秒 ~ 1 分
- ⑥乾 燥
- ⑦透 徹
- ⑧封 入

〔血球染色法〕

- ①固定・染色：メイグリュンワルド染色液を約 10 滴加える
..... 2 ~ 3 分
- ②染 色：りん酸緩衝液(pH 6.4 ~ 6.8 1/15mol/l)を約 10 滴加える..... 2 ~ 3 分
- ③洗 浄：ギムザ希釈液で洗浄..... 2 ~ 3 秒
- ④染 色：ギムザ希釈液..... 10 ~ 15 分
- ⑤洗 浄：流水..... 15 ~ 30 秒
- ⑥乾 燥

ライト染色液

〔染色法 1 (ライト染色)〕

- ①固定・染色：ライト染色液 10 ~ 15 滴加える..... 2 ~ 3 分
- ②染 色：りん酸緩衝液(pH 6.4 ~ 6.8 1/15mol/l) 10 ~ 15 滴を①の上に滴下し混和する..... 4 ~ 7 分
- ③洗 浄：流水..... 15 ~ 30 秒
- ④乾 燥

〔染色法 2 (ライト・ギムザ染色)〕

- ①固定・染色：ライト染色液を約 10 滴加える..... 2 ~ 3 分
- ②染 色：りん酸緩衝液(pH 6.4 ~ 6.8 1/15mol/l)を約 10 滴加える..... 2 ~ 3 分
- ③洗 浄：ギムザ希釈液を上から流す..... 2 ~ 3 秒
- ④染 色：ギムザ希釈液..... 10 ~ 15 分
- ⑤洗 浄：流水
- ⑥乾 燥

* 備考：本染色性の特長として、顆粒は鮮明に染色されるが、核はあまり鮮明に染色されない。

コード No.	品 名	規 格	容 量	希望納入価格(円)
079-04391	ギムザ染色液	病理細胞診研究用	250ml	2,200
131-12811	メイグリュンワルド染色液	病理細胞診研究用	250ml	1,200
238-01541	ライト染色液	病理細胞診研究用	250ml	1,300

〔関連商品〕

コード No.	品 名	組成(1 包中)		規 格	容 量	希望納入価格(円)
		Na ₂ HPO ₄ (無水)	KH ₂ PO ₄			
166-14461	りん酸緩衝剤粉末 1/15mol/l, pH 6.4	2.5g	6.7g	生化学用	1 ℓ 用 × 20 包	3,700
163-14471	りん酸緩衝剤粉末 1/15mol/l, pH 6.8	4.7g	4.5g	生化学用	1 ℓ 用 × 20 包	3,700

病理組織包埋用パラフィン

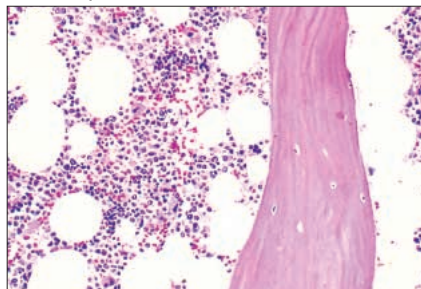
Pathoprep® 568

パソプレップ 568 はロット間の品質のバラツキをなくし、均一な炭素分布を持つ精製パラフィンに安全かつ安定な高分子化合物を添加した病理用包埋剤です。下記の特長と安全性を備えています。

ペレットタイプで取扱いやすい
組織への優れた浸透性
薄切性に優れている

- ・ 1 ~ 2 μ m の超薄切切片が切れる
- ・ 連続切片が安定に得られる
- ・ ミクロトームでの切れ具合は適度に堅く、腰が強い

HE 染色

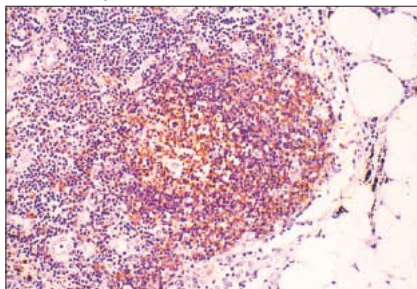


骨脱灰 2 μ m (×100)

- ・ できた薄切切片はミクロトームへの巻き付きが少なく、取扱いやすい
- ・ 切片の伸展性良好
- ・ 湯浴中での伸展性は良好
- ・ 伸展器(40 ~ 50)で伸展させても、組織とパラフィンの剥離、ひび割れ、収縮膨張は無い
- ・ 脱パラフィンがスムーズに行われ、染色性に問題は無い
- ・ 安全性テスト合格品

- ・ FDA 法に準じた食品に対する適合性テスト **合格**
- ・ 日本薬局方パラフィン試験適合性 **合格**

ABC 染色



ヒトリンバ節組織 pan B 2 μ m (×200)



- ・ マウスに対する経口急性毒性試験 [LD₅₀] 16.0g/kg 以上
- ・ 70℃、長時間熔融しても有害な揮発成分は認められない
- ・ 使いやすい包装形態
- ・ 片手で持って注ぎやすいコンパクトサイズの容器設計
- ・ パラフィンを容器に入れたまま熔融可能(70℃ 約1週間が限度)
- ・ 便利な使い捨て容器の上、一般ゴミとして焼却処理できる環境にやさしい包材を使用

融点：56 ~ 58

保存条件：冷所保存(30℃以下)

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
162-18961	パソプレップ 568	病理組織包埋用	500g × 1 ダース	13,000

細胞診染色『パパニコロウ染色』染色液 3 種

パパニコロウ染色は組織検査の HE 染色に相当する汎用の染色法であり、がんの診断のための検査法としても重要なものです。

染色操作法

95%エタノール	30分
95%エタノール	10回
80%エタノール	10回
70%エタノール	10回
50%エタノール	10回
水洗	かるく
Pap.ヘマトキシリン染色液	3分
水洗	かるく
0.5%塩酸水	適当に

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
168-18941	パパニコロウ・ヘマトキシリン染色液	病理細胞診研究用	250ml	2,200
161-18931	パパニコロウ OG100 染色液	病理細胞診研究用	250ml	2,200
164-18921	パパニコロウ EA100 染色液	病理細胞診研究用	250ml	2,500

水洗	5分
50%エタノール	10回
70%エタノール	10回
80%エタノール	10回
95%エタノール	10回
Pap. OG100 染色液	1分
95%エタノール	10回
95%エタノール	10回
Pap. EA100 染色液	2分

95%エタノール	10回
95%エタノール	10回
100%エタノール	10回
100%エタノール	10回
100%エタノール	10回
キシレン	10回
キシレン	10回
キシレン	10回
封入	

水質試験用試薬 品目追加！

上水試験法に記載されている、消毒副生成物の標準品(液)を商品化しました。既存品と併せてご利用下さい。

PFBOA 誘導化分枝アルデヒド類標準品

水質試験用

分枝アルデヒド類を PFBOA (ペンタフルオロベンジルヒドロキシルアミン) で誘導体化した商品です。(E), (Z) 体の混合物です。

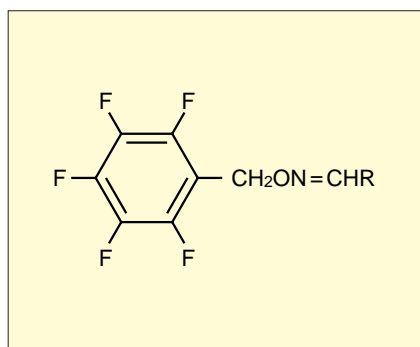
コード No.	品名	R	容量	希望納入価格(円)
163-19111	PFBOA-Isobutyraldehyde Std.	CH(CH ₃) ₂	100mg	15,000
160-19121	PFBOA-Isovaleraldehyde Std.	CH ₂ CH(CH ₃) ₂	100mg	15,000
167-19131	PFBOA-2-Methylbutanal Std.	CH(CH ₃)C ₂ H ₅	100mg	15,000
164-19141	PFBOA-Pivalaldehyde Std.	C(CH ₃) ₃	100mg	15,000

〔関連商品〕

直鎖アルデヒド類 PFBOA 誘導体化標準品

コード No.	品名	R	容量	希望納入価格(円)
161-18311	PFBOA-Formaldehyde Std.	H	100mg	15,700
168-18321	PFBOA-Acetaldehyde Std.	CH ₃	100mg	15,000
165-18331	PFBOA-Propionaldehyde Std.	CH ₂ CH ₃	100mg	15,000
162-18341	PFBOA- <i>n</i> -Butyraldehyde Std.	(CH ₂) ₂ CH ₃	100mg	15,700
169-18351	PFBOA- <i>n</i> -Valeraldehyde Std.	(CH ₂) ₃ CH ₃	100mg	15,700
166-18361	PFBOA- <i>n</i> -Hexanal Std.	(CH ₂) ₄ CH ₃	100mg	15,000
163-18371	PFBOA- <i>n</i> -Heptanal Std.	(CH ₂) ₅ CH ₃	100mg	15,000
160-18381	PFBOA- <i>n</i> -Octanal Std.	(CH ₂) ₆ CH ₃	100mg	15,000

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
165-16751	<i>O</i> -(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)-hydroxylamine Hydrochloride	水質試験用	1g	14,000



ハロ酢酸類・ハロアセトニトリル類標準液

水質試験用

上水試験法記載のハロ酢酸類・ハロアセトニトリル類の標準液を追加しました。

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
024-13251	Bromoacetic Acid Std. Soln. (1mg/ml TBME)	2ml × 10A	9,000
038-16871	Chloroacetic Acid Std. Soln. (1mg/ml TBME)	2ml × 10A	9,000
209-14001	Trichloroacetonitrile Std. Soln. (1mg/ml TBME)	2ml × 10A	9,000
086-07261	Haloacetic Acid Mixed Std. Soln. (ea. 1mg/ml TBME) 内容: Bromoacetic Acid, Chloroacetic Acid, Dichloroacetic Acid, Trichloroacetic Acid	2ml × 10A	12,000

〔関連商品〕

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
041-24471	Dichloroacetic Acid Std. Soln. (1mg/ml TBME)	2ml × 10A	9,400
201-12861	Trichloroacetic Acid Std. Soln. (1mg/ml TBME)	2ml × 10A	9,400
048-24481	Dichloroacetonitrile Std. Soln. (1mg/ml AcCN)	2ml × 10A	8,400

* 関連商品は水道法・監視項目に該当します。

Toluene

大気汚染物質測定用

大気中の揮発性有機ハロゲン化合物等の測定の際、捕集管(活性炭チューブ等)に捕集した試料の脱着溶媒として使用されます。

本品は、GC/ECD 及び GC/MS において、有機ハロゲン化合物がほとんど含まれないことを確認しています。

〔規格〕

含量(cGC) : 99.7%以上
GC(ECD)分析適合性: 試験適合
GC(MS)分析適合性: 試験適合
208-14135 500ml 6,000円

〔関連商品〕

Fluorobenzene Standard

大気汚染物質測定用

068-03721 1g 5,000円

Toluene-*d*₈ Standard

大気汚染物質測定用

204-14311 1g 照会

ゴルフ場農薬試験 (GC/MS) 用

32 種農薬混合標準液

ゴルフ場使用農薬目標基準値が設定されている農薬のうち、GC/MS 法により測定される 32 農薬の混合標準液です。

〔内容〕

- | | | | |
|--------------------|----------------------------|--------------------|---------------------------------------|
| 1. アセフェート | 10. DEP (トリクロルホン) | 18. イソキサチオン | 27. プロピザミド |
| 2. メタミドホス | 11. ダイアジノン | 19. MBPMC (テルブカルブ) | 28. ビリブチカルブ |
| 3. ベンスリド (SAP) | 12. ジチオビル | 20. MER フェントロチオン) | 29. ビリダフェンチオン |
| 4. ベスロジン (ペンフルラリン) | 13. エクロメゾール (エトリジア
ゾール) | 21. メプロニル | 30. トルクロホスメチル |
| 5. ブタミホス | 14. フルトラニル | 22. メタラキシル | 31. TPN (クロロタロニル) |
| 6. キャプタン | 15. イプロジオン | 23. メチルダイムロン | 32. トリクロピルプトキシエチル
各 10µg/ml アセトン溶液 |
| 7. CAT (シマジン) | 16. イソフェンホス | 24. ナプロバミド | |
| 8. クロロネブ | 17. イソプロチオラン | 25. ペンシクロン | |
| 9. クロルピリホス | | 26. ペンディメタリン | |

〔保存条件〕 - 20 ・ 遮光保存

〔ご使用上の注意〕

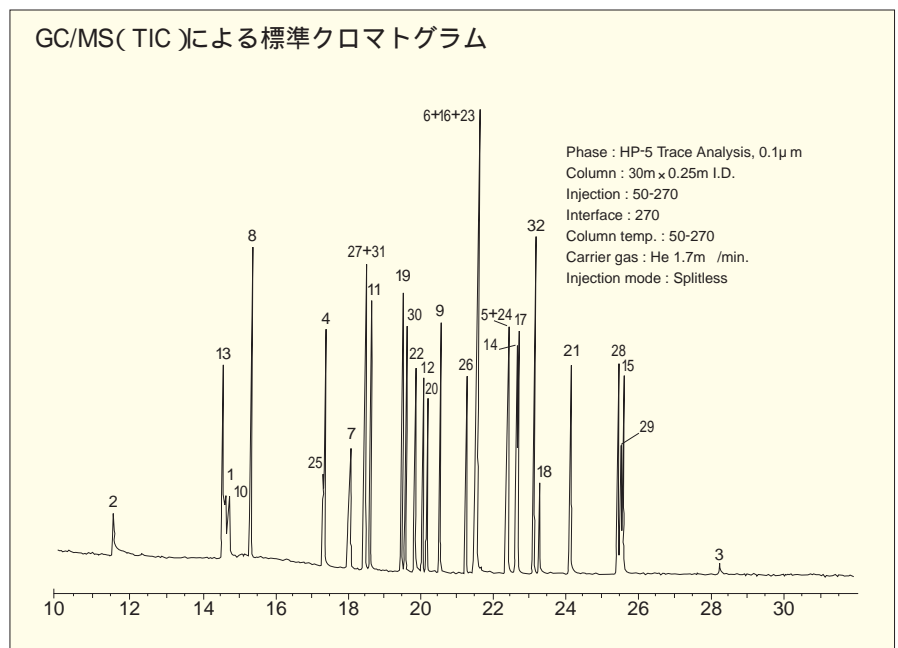
2 ~ 10 保存下では徐々に分解しますので、必ず上記保存条件にて保存して下さい。

希釈後の溶液は 2 ~ 10 保存下で徐々に分解しますので、希釈後はできるだけ速やかにご使用下さい。(本品をアセトンで 20 倍希釈した場合、DEP は直ちに分解します。)

試料酸化室のガラスインサートは不活性化処理したものをご使用下さい。不活性化処理をしていないインサートを用いて分析を行った場合、DEP 及びメチルダイムロンが分解するおそれがあります。

希釈に用いる溶媒は、高純度の分析用グレードをご使用下さい。

アンプル中には約 1.2ml 入っています。



コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
162-19201	32 種農薬混合標準液	残留農薬試験用	1ml x 5A	45,000

不活性化 (シラン) 処理用

5w/v%ジメチルジクロロシラントルエン溶液

ガスクロマトグラフィーにおける、試料酸化室のガラスインサートや石英ウールの不活性化処理 (シラン処理) にご使用下さい。

〔方法〕

清浄な試験管を用意する。

インサートを水洗浄、希塩酸 (1%) 洗浄後、乾燥する。

試験管に本品 (5%ジメチルジクロロシラントルエン溶液) を入れ、インサート全体が浸るようにする。試験管に栓をし、ドラフト内等換気の良いところに約 10 時間放置する。試験管から取り出し、メタノールで洗浄する。室温にて乾燥する。(ドラフト内 約 2 時間)

乾燥後は蓋のある容器に入れ、暗所に保存する。上記操作時、インサートを直接手で触れないようにして下さい。(ピセット等でお取り扱い下さい。) 同様な操作で石英ウールも不活性化処理できます。

〔保存条件〕

不活性ガス封入・2 ~ 10 ・ 遮光保存

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格 (円)
045-26375	5w/v%ジメチルジクロロシラントルエン溶液	ガスクロマトグラフ用	500ml	10,000

関連商品

水質・環境試験(HPLC)用

8種農薬混合標準液 残留農薬試験用

〔内容〕

アシュラム、ベンスリド(SAP)、イプロジオン、MCP(メコプロブ)、ベンシクロン、チウラム、TPN(クロロタロニル)、シデュロン
各 100 μ g/ml アセトニトリル溶液

160-18401 1ml \times 5A 25,000 円

水質・環境試験(HPLC)用

オキシシン銅標準液 残留農薬試験用

〔内容〕

50 μ g/ml メタノール溶液

159-01961 1ml \times 5A 10,000 円

水質試験(GC/MS)用

4種農薬混合標準液 残留農薬試験用

〔内容〕

ダイアジノンオキソン、EPN オキソン、イソキサチオンオキソン、MEP オキソン(フェニトロチオンオキソン)
各 100 μ g/ml アセトン溶液

167-18411 1ml \times 5A 20,000 円

下水道試験用

有機りん農薬混合標準液 残留農薬試験用

〔内容〕

EPN、メチルジメトン、メチルパラチオン、パラチオン
各 1mg/ml トルエン溶液

「毒物劇物取締法」に基づく「特定毒物研究者指定証」が必要です。

153-01481 1ml \times 5A 15,000 円

水質・環境試験(GC/MS)用

13種農薬混合標準液 残留農薬試験用

〔内容〕

ベンチオカーブ(チオベンカルブ)、BPMC(フェノカルブ)、CAT(シマジン)、CNP(クロルニトロフェン)、DDVP(ジクロルボス)、ダイアジノン、EPN、IBR(イプロベンホス)、イソプロチオン、イソキサチオン、MER(フェニトロチオン)、プロピザミド、TPN(クロロタロニル)
各 10 μ g/ml アセトン溶液

164-18421 1ml \times 5A 25,000 円

マイクロシスチン測定用

マイクロシスチン分解物標準品(MMPB)

水質試験用

富栄養化の進んだ湖沼ではアオコによる水質汚染の影響が問題となっています。アオコを形成している藍藻類が作る代表的な毒素『マイクロシスチン』は、現在 60 種類ぐらいの誘導体が知られています。マイクロシスチンの分析は、従来より HPLC 法による各成分の分析が行われておりますが、試料の調製が煩雑であるなど種々の問題があります。

最近、新しい測定法としてマイクロシスチンの毒性発現に重要な Adda 構造に着目したマイクロシスチン分解物(MMPB)測定法が開発されました¹⁾。この方法はマイクロシスチンの Adda 構造の二重結合を切断し、遊離する 2-Methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric Acid (MMPB) を測定することにより、全マイクロシスチン量の定量が可能となります。

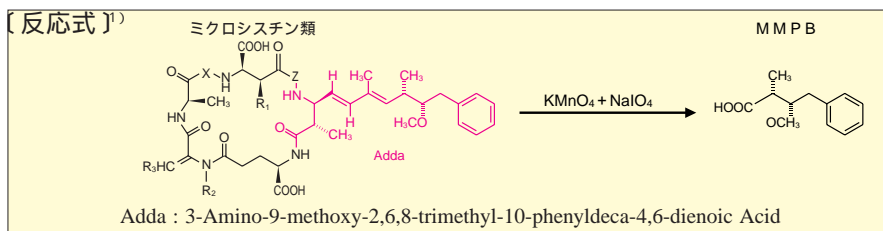
本品は、マイクロシスチン分解物測定法に使用される MMPB 標準品と GC-MS 分析に必須な MMPB-*d*₃ 標準品です。

〔規格〕

含量(HPLC)..... 97.0% 以上

〔参考文献〕

- 1) Sano, T., Nohara, K., Shiraishi, F. and Kaya, K. : *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 49, 163 (1992).



コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)
130-12881	erythro-2-Methyl-3-(methoxy- <i>d</i> ₃)-4-phenylbutyric Acid Sodium Salt Standard (MMPB- <i>d</i> ₃ Sodium Salt)	1mg	45,000
133-12871	erythro-2-Methyl-3-methoxy-4-phenylbutyric Acid Sodium Salt Standard (MMPB Sodium Salt)	1mg	40,000

*本品は erythro 体の為、(2*R*,3*S*) 体と (2*S*,3*R*) 体の混合物です。

関連商品

コード No.	品名	容量	希望納入価格(円)		
300-05191	常盤化学工業(株)マイクロシスチン ELISA キット	96 回用	75,000		
コード No.	品名	含量(HPLC)	規格	容量	希望納入価格(円)
136-12241	Microcystin LR	95.0% 以上	生化学用	250 μ g	15,000
133-12251	Microcystin RR	95.0% 以上	生化学用	250 μ g	15,000
132-12841	Microcystin YR	95.0% 以上	生化学用	100 μ g	15,000

大気中のアルデヒド、ケトンの HPLC 分析

和光純薬工業(株) 大阪研究所 上森 仁志

アルデヒドは有害大気汚染物質として、国内では大気汚染防止法(2成分)、悪臭防止法(6成分)により、また米国では、EPA等により15成分の測定法が示され、2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン(DNPH)誘導体としてGCまたはHPLCにより分析されている。ODS(C18)シリカを用いるHPLC分析法は、GC法で必要となる未反応の2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンの除去やアセトニトリルから酢酸エチル溶液への転溶操作が不要等の理由から広範に利用されている。大気汚染防止法によれば、ホルムアルデヒドおよびアセトアルデヒドの2成分が優先取組物質に指定され、また悪臭防止法においてもアセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、n-ブチルアルデヒド、イソブチルアルデヒド、n-バレルアルデヒド、イソバレルアルデヒドの6成分が規制の

対象になっている。

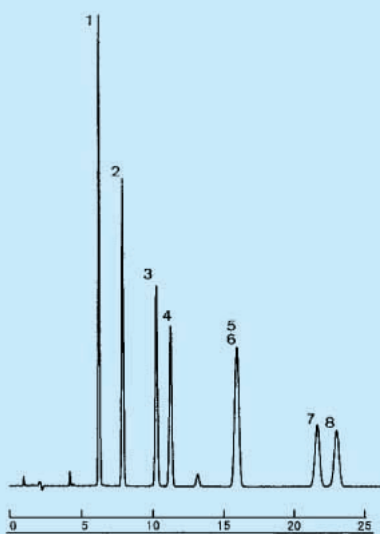
今回、当社のODSシリカを用いた場合の分離の最適化検討(定量性、検出限界、妨害物の影響、分析時間等)を実施した結果、Wakosil-II 5C18RS充填剤を用いた時に最適分離結果が得られた。DNPH誘導体化標準液の分析は、市販のDNPH誘導体標準品をアセトニトリルに溶解し標準液とし、屋外大気サンプルの分析は、屋外大気をDNPH含浸シリカカートリッジカラムで誘導体化後アセトニトリルで溶出し、HPLCにて分析した。この時の分離の状況を図1に示した。実検体の分析においても妨害物の影響を受けず、検量線は、0~50ngの範囲で原点を通る良好な直線関係を示し、その

時の相関係数 $r = 0.9999$ が得られた。また各成分の検出限界を表1にまとめて示した。

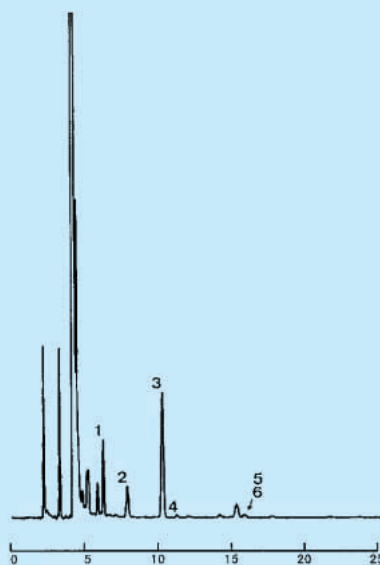
Table1. Limit of detection
(as aldehyde and ketone)

Formaldehyde	12.3pg
Acetaldehyde	18.5pg
Acetone	32.6pg
Propionaldehyde	35.8pg
Isobutyraldehyde	82.0pg
Butyraldehyde	82.0pg
Isovaleraldehyde	89.0pg
Valeraldehyde	108.2pg

標準品の分析



屋外大気試料の分析



HPLC Conditions

Column : Wakosil- II 5C18RS
 Column size : 4.6mmφ × 250mm
 HPLC system : Shimadzu LC-6A
 Eluent : CH₃CN/H₂O=60/40(v/v)
 Flow rate : 1.0ml/min at 40
 Detector : UV 360nm, 0.04Aufs
 Inj. Vol. : 10μl each 0.75μg/ml
 (as aldehyde, ketone)

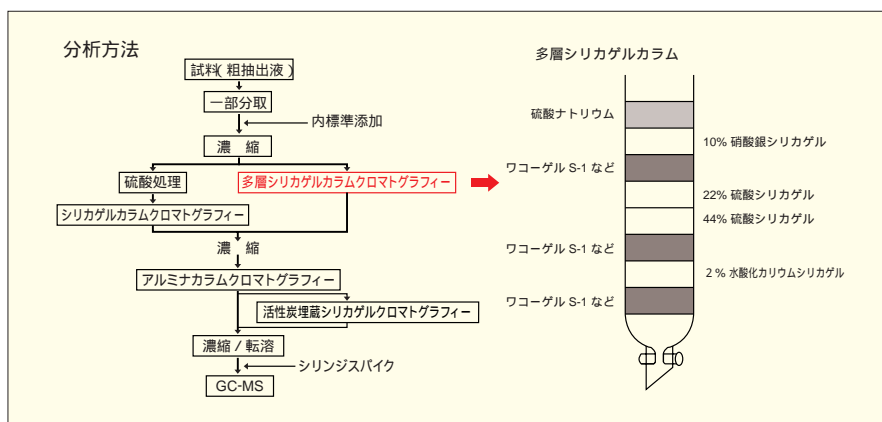
Sample : -2,4-DNPH/ 1. Formaldehyde,
 2. Acetaldehyde, 3. Acetone,
 4. Propionaldehyde, 5. Iso-
 butyraldehyde, 6. n-Butyral-
 dehyde, 7. Isovaleraldehyde
 8. n-Valeraldehyde

(注) ODS カラムを用いた場合には DNPH-
 n-ブチルアルデヒド、DNPH-イソ
 ブチルアルデヒドが重複している。

図1 DNPH-アルデヒド類の分析例

わずらわしい調製が不要に !! ダイオキシン類分析用化学修飾シリカゲル

排ガス、土壤中などのダイオキシン類を分析する際、試料のクリーンアップに多層シリカゲルカラムクロマトグラフィーが用いられます。本品は多層シリカゲルカラムの作製時に使用する化学修飾シリカゲルであり、それぞれ水酸化カリウム、硝酸銀、硫酸の濃度を2%、10%、44%、22%になるよう調製した製品です。

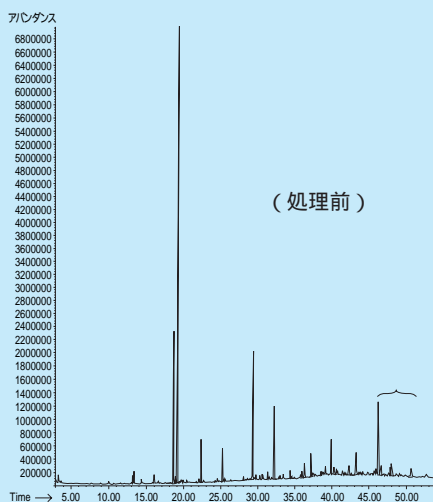


◎クリーンアップ性能

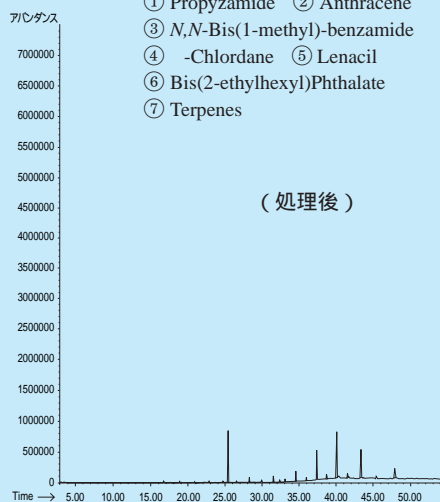
操作方法



試料には分析時の爽雑物質の指標としてアントラセンを、分析対象物の指標としてγ-クロルデンをそれぞれ添加しています。



(処理前)



(処理後)

- ① Propyzamide ② Anthracene
- ③ N,N-Bis(1-methyl)-benzamide
- ④ -Chlordane ⑤ Lenacil
- ⑥ Bis(2-ethylhexyl)Phthalate
- ⑦ Terpenes

カラムクロマト管に充てん後、ダイオキシン類分析用 n-ヘキサンなどの溶媒で洗浄を行って下さい。

〔参考資料〕

- 1) 厚生省生活衛生局水環境部環境整備課：廃棄物処理におけるダイオキシン類標準測定分析マニュアル
- 2) 環境庁大気保全局大気規制課：有害大気汚染物質測定方法マニュアル

コード No	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
167-19251	2% Potassium Hydroxide-impregnated Silica Gel	ダイオキシン類分析用	100g	17,000
197-11611	10% Silver Nitrate-impregnated Silica Gel	ダイオキシン類分析用	100g	17,000
191-11631	44% Sulfuric Acid-impregnated Silica Gel	ダイオキシン類分析用	100g	17,000
194-11621	22% Sulfuric Acid-impregnated Silica Gel	ダイオキシン類分析用	100g	17,000

〔関連商品〕

コード No	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
203-14141	Toluene	ダイオキシン類分析用	1ℓ	4,000
209-14143			3ℓ	9,000
083-07391	Hexane (n-)	ダイオキシン類分析用	1ℓ	3,500
048-26321	Dichloromethane	ダイオキシン類分析用	1ℓ	4,500
044-26323			3ℓ	11,500
019-11941	Active Carbon-impregnated Silicagel	ダイオキシン分析用	10g	16,800
197-07485	Sodium Sulfate	PCB・フタル酸エステル試験用	500g	3,400
230-00261	Wakogel® S-1(for determination of PCB)	カラムクロマトグラフ用	250g	10,500

試料前処理用 固相抽出カラム(カートリッジタイプ) プレセップ®-Cシリーズ

複雑な組成の試料から目的の物質のみを抽出する方法として、液-液抽出法が汎用されてきましたが、近年、環境への配慮などからさまざまな手法、技術が開発され応用されるようになりました。

HPLC、GC分析などの試料の前処理として用いられる固相抽出法は、簡便で溶媒使用量も少ないなどの利点から、従来の液-液溶媒抽出法に代わって多く使用されるようになりました。環境分析、食品分析に関する公定法でも多く採用されるようになり、この方法を用いる技術が発展すると思われます。

前述のように固相抽出法は、簡便、使用溶媒量が少ないだけでなく次のような利点があります。

1. 多検体を同時に短時間で処理できる
2. 再現性が良く、また回収率も高い
3. 高濃縮倍率が得られる

現在用いられている固相抽出用カラムには、両端密閉型のカートリッジタイプと一端が開放型のシリンジタイプとがあり、また充てん剤もさまざまな種類があります。

このたび当社では両端密閉型カートリッジカラムプレセップ®-Cシリーズを商品化いたしました。カートリッジタイプの特長としては、

1. 固相抽出時に加圧及び減圧いずれの方式でも使用可能
2. 充てん剤種、量等目的に応じ数個連結可能

すでに多くの方にご利用いただいております当社の充てん剤を充てんし、再現性良く安心してご利用いただけるよう厳重に品質管理をしております。

〔製品の主な試験項目〕

1. 乾燥減量
2. 基本性能試験
3. 回収率試験

〔基本性能試験例〕

使用カラム：プレセップ®-C シリカゲル
試験方法：本品をHPLCに接続し下記条件で分析、ピーク形状から充てん状態を確認

Eluent : *n*-Hexane/CH₃CN=99/1

Flow Rate : 2.0ml/min . at 35

Detection : UV254nm , 0.08AUFS

Sample : 1)Toluene

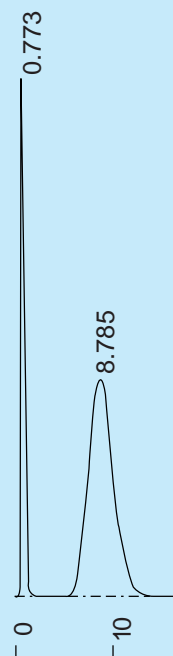
2)Dimethyl Phthalate

1)/ 2)/*n*-Hexane=1/1/48(V/V/V)

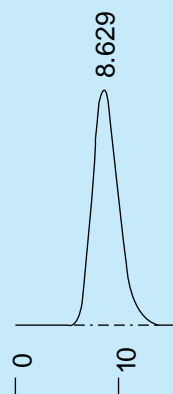
Injection Volume : 20μl



左記条件にてのクロマトグラム



左記条件にてのクロマトグラム



〔回収率試験例〕

使用カラム：プレセップ®-C シリカゲル
試験方法：本品をHPLCに接続し下記条件で分析、ピーク面積値から回収率を測定

Eluent : *n*-Hexane/CH₃CN=99/1

Flow Rate : 2.0ml/min . at 35

Detection : UV254nm , 0.08AUFS

Sample : Dimethyl Phthalate/
n-Hexane=1/49(V/V)

Injection Volume : 20μl

〔次項へ続く〕

サンプル包装を用意しておりますのでご請求下さい。

コード No.	品名	規格	包装	希望納入価格(円)
294-31851	Presep [®] -C Silica Gel	試料前処理用	10個×5	25,000
290-31951	Presep [®] -C Florisil [®]	試料前処理用	10個×5	25,000
292-32251	Presep [®] -C C18 (ODS)	試料前処理用	10個×5	25,000
296-32151	Presep [®] -C Na ₂ SO ₄	試料前処理用	10個×5	25,000

〔関連商品〕

シリンジタイプ用固相抽出カラム

コード No.	品名	規格	包装	希望納入価格(円)
291-26851	Presep [®] -Agri	残留農薬試験用	50個	38,000

ポリマーゲル(スチレンジビニルベンゼン-メタクリレート系ポリマー)を吸着素材に用いて、残留農薬を迅速かつ簡便に前処理するシリンジタイプの固相抽出用カラムです。

Information

大幅値下げしました!!

ダイオキシン測定用キット

STRATEGIC DIAGNOSTICS INC. DIOXIN RIS[®] TEST

DIOXIN RIS[®] TEST はエンザイムイムノアッセイ(EIA)法により、2,3,7,8-TCDDを定量～半定量的に測定するキットです。

〔特長〕

1. ng/l ~ pg/l の濃度の 2,3,7,8-TCDD を測定することができます。
2. キットには毒性の高い 2,3,7,8-TCDD が含まれていません。
3. EIA法により簡易な測定が可能です。

〔キット構成〕

- ・抗ダイオキシン抗体コーティングチューブ 10本
- ・ダイオキシン結合酵素 1.5ml 用
- ・試料希釈緩衝液 5ml × 1
- ・10倍濃縮洗浄液 50ml × 1
- ・基質 A 5ml × 1
- ・基質 B 5ml × 1
- ・反応停止液 5ml × 1
- ・TriCDD 標準液 200 μ l × 1

旧価格 300,000円/10テスト用

新価格 180,000円/10テスト用

532-48211 10テスト用 180,000円

近日発売!

スチレンダイマー・トリマー標準品 環境分析用

環境ホルモンの疑いのある物質の一つに、ポリスチレン容器中に残存しているスチレンダイマー・トリマーが上げられておりその実態解明が進められています。

詳しくは資料をご請求下さい。

☎ お客様相談室を開設 ☎

和光純薬ではこの度お客様相談室を開設いたしました。
試薬の製品内容、使用方法等はこちらにお願いいたします。

フリーダイヤル **0120-052-099**

フリーファックス **0120-052-806**

(フリーダイヤルの受け付け時間は平日の9:30 ~ 17:00です。お問合わせは受け付け時間内をお願いいたします。)

E-mail アドレス labchem-tec@wako-chem.co.jp (西日本)
labchem-tect@wako-chem.co.jp (東日本)
ホームページアドレス http://www.wako-chem.co.jp

紙の使い易さとシリカゲルの分離性が合体

Chromato Sheet

薄層クロマトグラフ用

クロマトシートは「紙」の利点を最大限に生かした「軽量で使いやすい」「廃棄の問題もない」環境にやさしい製品です。従来の薄層クロマトプレート(TLCプレート)と異なり、特殊な技術でシリカゲルと蛍光剤 F₂₅₄ を「紙」の繊維に固定したもので、「紙の使いやすさ」と「シリカゲルの分離性(吸着、分配モード)」が得られます。TLC分離、プロットイング等、種々の用途にご利用下さい。

特長

- ・ TLCプレート同様、分離性・再現性に優れる
- ・ はさみで容易に、任意の大きさに切断できる
- ・ かさばらず保管しやすく、そのままファイルもできる
- ・ クロマトシート上に鉛筆等での記入ができる
- ・ 粉落ちしない
- ・ プロットイング可能
- ・ 紫外線検出(254nm)可能

クロマトシート仕様

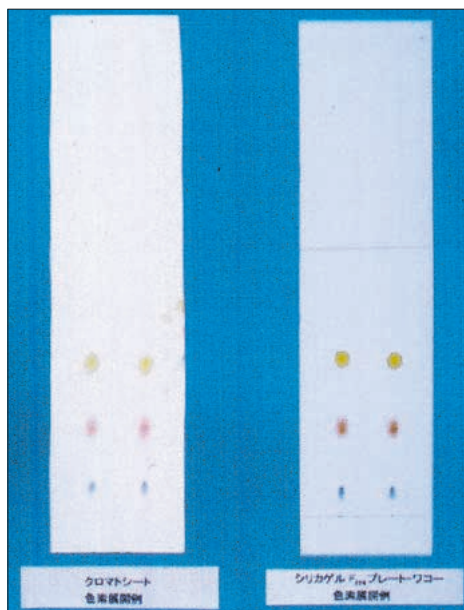
大きさ : 20cm × 20cm

厚さ : 約 0.3mm

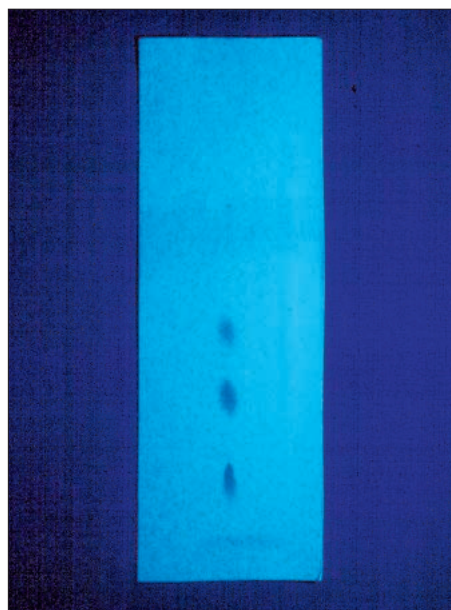
重さ : 約 7g/枚

包装 : 25枚入り

使用シリカゲル : 粒径5 ~ 20 μ m 破碎状、F₂₅₄ 蛍光剤入り
(紙の特性のため全体が青みがかって見えます)



クロマトシートとシリカゲル 70F₂₅₄ プレートワークーの比較
サンプル : ワコーゲルB テスター
(バタ-エロ-,ズダンレッドG、インドフェノ-ル)
展開溶媒 : クロロホルム



クロマトシートの紫外線(254nm)による検出例
サンプル : プルシン、オキシプロピルテオフィリン、カフェイン
展開溶媒 : クロロホルム9+メタノール1

サンプル包装を用意しておりますのでご請求下さい。

コード No.	品名	規格	容量	希望納入価格(円)
036-17151	Chromato Sheet (20cm × 20cm)	薄層クロマトグラフ用	25枚	10,000

掲載されている試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるものであり、家庭用、医療用等の用途には用いられません。

希望納入価格には消費税等が含まれておりません。

発行所 和光純薬工業株式会社
〒540-8605
大阪市中央区道修町三丁目1番2号
TEL. 06-203-3741(代)

発行日 1998年7月15日
発行責任者 岸井松司
編集責任者 大西礼子
印刷所 共進社印刷株)