

## 1. 電気泳動

### 1.1 電気泳動について

#### 1.1.1 ポリアクリルアミドゲル電気泳動とは

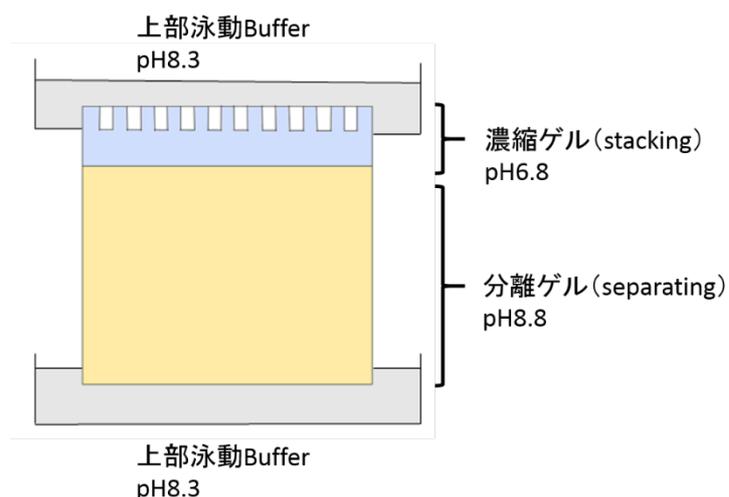
一般にガラスなどのプレート間に作成したゲルを垂直に立てて電気泳動する方式。

緩衝液などに溶解した核酸やタンパク質をポリアクリルアミドゲルに添加し、緩衝液中で一定時間電気泳動をすることでサイズや分子量、荷電、立体構造などに応じた移動度を示す。

#### 1.1.2 SDS-PAGE

タンパク質やペプチドは構成アミノ酸や溶けている緩衝液の濃度によって+にも-にも荷電するため、SDS という陰イオン性界面活性剤をタンパク質に結合させ、タンパク質を一過性に-に荷電させ陽極側に移動させる手法。

### 1.2 ゲルの仕組み

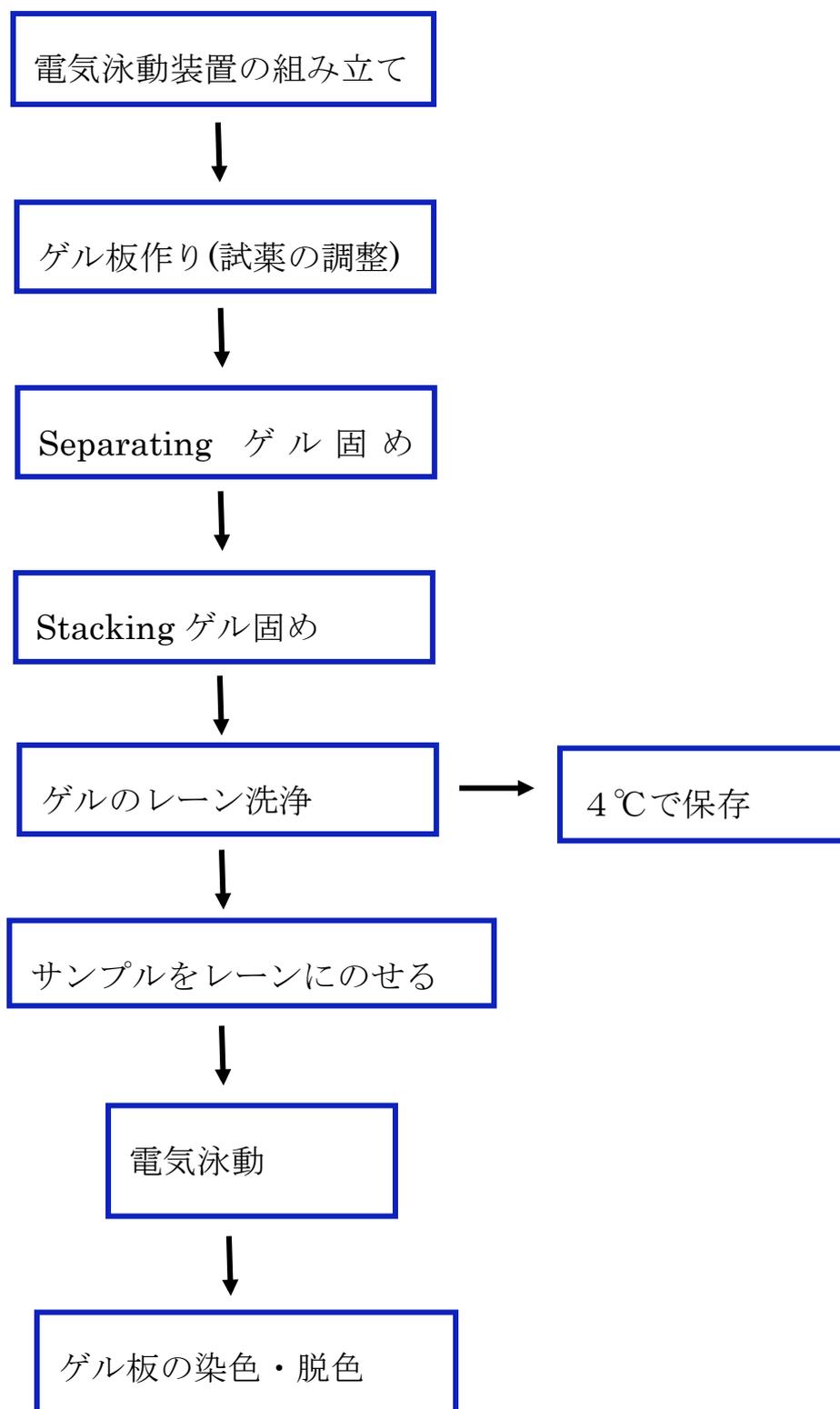


SDS-PAGE にはアクリルアミドゲル、サンプル、泳動 Buffer から構成されており異なる緩衝液が用いられる。泳動用の Buffer には Tris-Glycine-SDS が使用され、泳動 Buffer に SDS を加えるのは、タンパク質の SDS 化を維持するため。

また、タンパク質が濃縮ゲルで濃縮されたり、分離ゲルで分離されるのは pH の差が異なるからである。濃縮ゲルはアクリルアミドの濃度が低く、孔径が大きいので分子ふるいとしての効果はほとんどない。イオンが濃縮ゲルを抜けて pH8.8 の分離ゲルに入ると、グリシンの持つ負の電荷が大きくなるため、移動度が上昇し、タンパク質を追い越す。これにより、タンパク質はそれぞれの分子量にしたがって分離されることになる。

## 2. 実験手順

### 2.1 実験のフローチャート



## 2.2 実験手順の詳細

### 2.2.1 電気泳動装置の組み立て

<準備>

- ・ガラス板（凹型と正方形の2種で一組）
- ・クリップ
- ・コーム
- ・シリコンゴム
- ・MilliQ
- ・エタノール



(1) まず、MilliQ で使用器具を  
ふきとる。

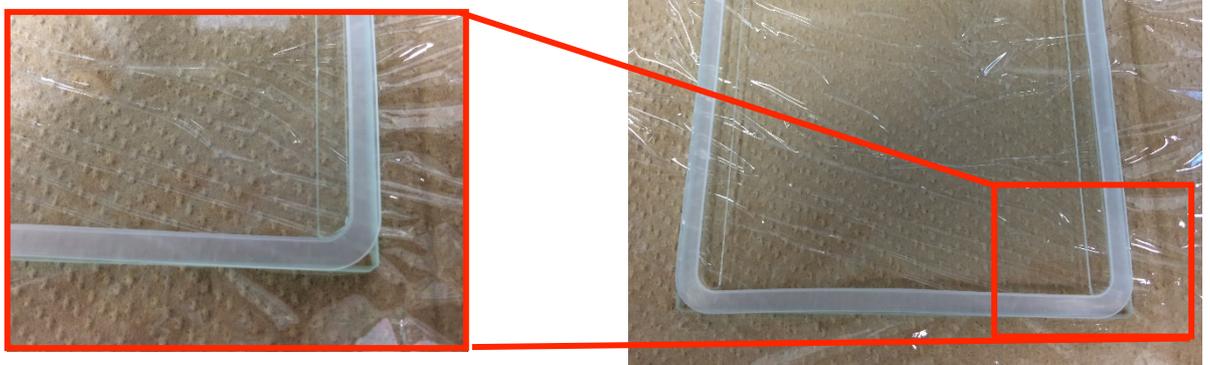
\*ガラス板にゲルの汚れが残っている  
可能性があるののでしっかりふく。

その後エタノールでもう一度使用器具を  
ふきとる。



(2) 正方形ガラス板にシリコンゴムをはめる。

\*ゲルの試薬を流し込んだときに液体が漏れ出るのを  
防ぐため、しっかりと角をあわせてはめる。



(3)凹型のガラス板を重ねて、  
ガラス板の両側を固定する。



### 2.2.2 ゲル板作り (試薬の調整)

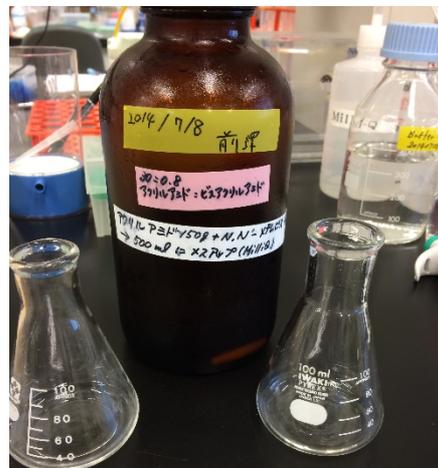
<準備>

- ・ 30:0.8 のアクリルアミド:ビスアクリルアミド
- ・ \*劇薬 (a.a とする)
- ・ BufferD
- ・ BufferE
- ・ MilliQ
- ・ 10%APS \*重合開始剤
- ・ TEMED \*重合開始剤
- ・ 小さい三角フラスコ (2 つ)





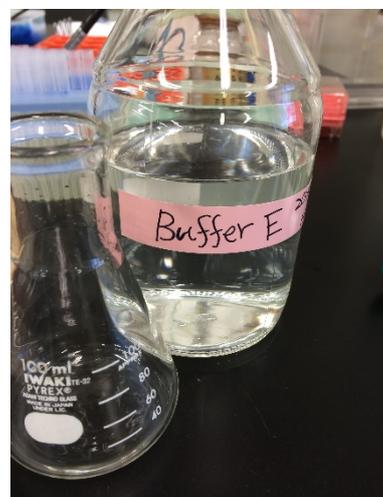
(1)10%APS と TEMED は最後に使用するの  
 ため 30:0.8(a.a)、BufferD,E、MilliQ  
 を準備する。



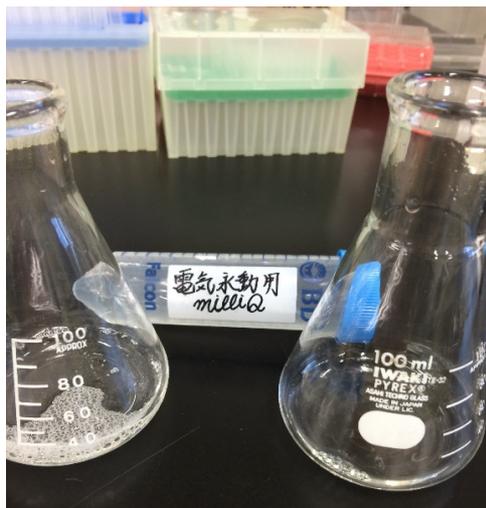
(2)フラスコを separating と stacking の 2つ  
 準備し、それぞれに 3.0ml,0.8ml の a.a をい  
 れる。



(3)2.0ml の BufferD を separating の  
 フラスコに入れる。



(4)0.5ml の BufferE を stacking のフラスコ  
 に入れる。



(5) 1.0ml, 1.2ml の MilliQ をの各フラスコにいれ、フラスコ内の試薬を混ぜる。



(6) まず、separating のフラスコに APS60  $\mu$ l と TEMED4.2  $\mu$ l を入れる。

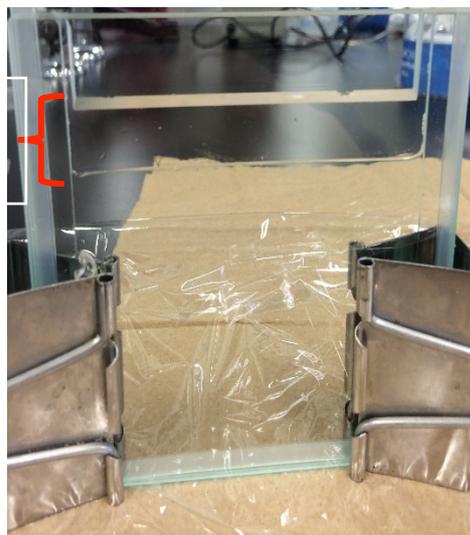
\* ピペットにあらかじめ両方の試薬をとり、素早く両方ともいれて、フラスコ内の試薬をよく混ぜる。泡立ちやすいので気を付ける。



(7) ガラス板の間に、separating の試薬を流し込む。

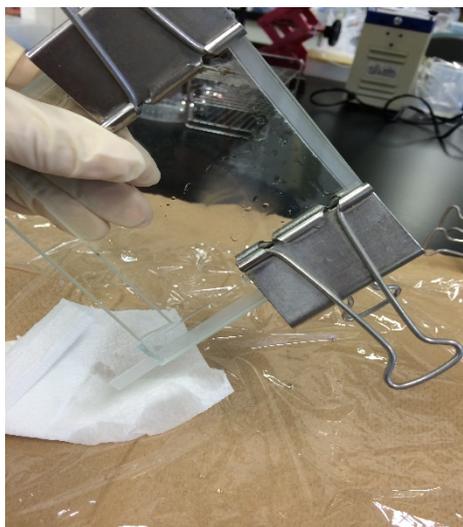
\* ガラス板を斜めにして、フラスコの口の部分をガラス板につけると流しやすい。

2cm



(8) 凹型のガラス板に対して、2 cm のこして流し込む。

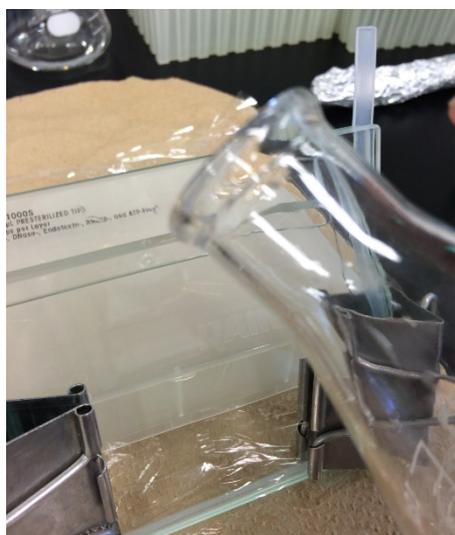
流し込んだ後、MilliQ を 1ml ピペットで入れる。約 10~15 分まつ。



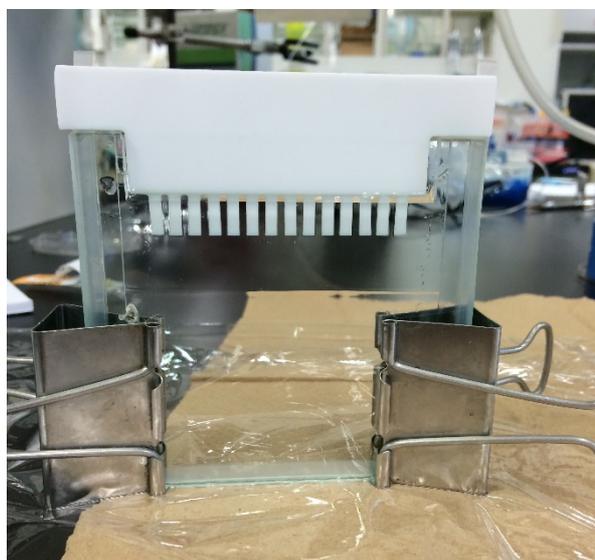
(9)15分経過したら、JKワイパーに MilliQ を取り出す。



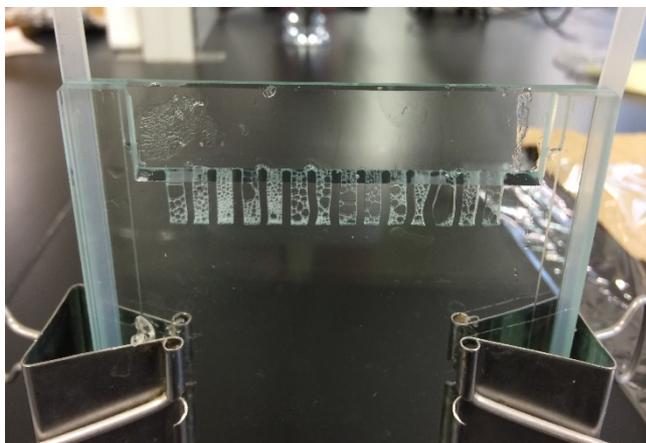
(10)stacking のフラスコに(6)と同様の要領で APS $24\mu\text{l}$ ,TEMED $2.4\mu\text{l}$  をいれてよく混ぜる。



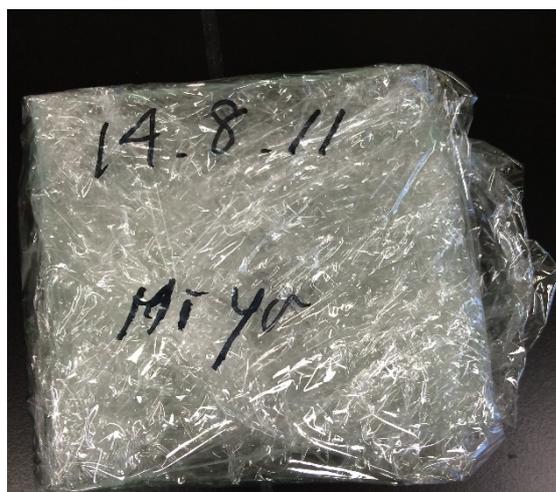
(11)ガラス板に stacking の試薬を流し込む。凹型の部分まで入れる。



(12)コームをさしてゲル板が固まるまで約 40~60 分程まつ。



(12) コームとシリコンゴム、クリップをはずし、ガラス板ごとコーム側の部分を水道水で流す。



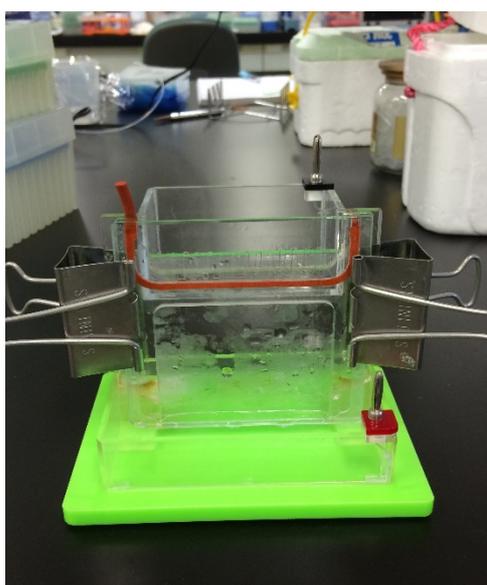
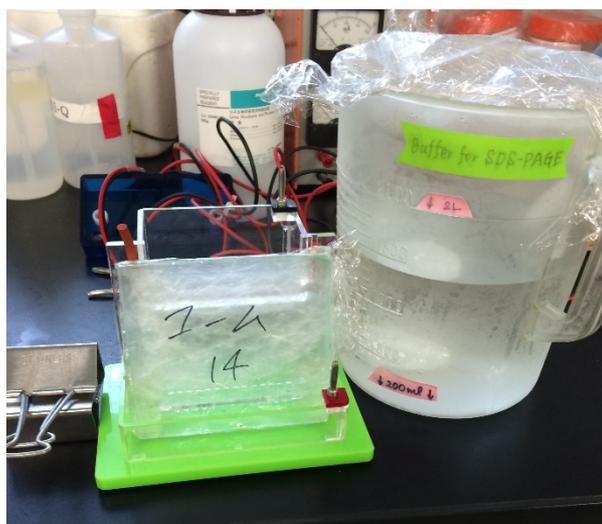
(13) サランラップにガラス板を包み、4℃で保管する。  
約一週間が保存期間の目安である。

\* 作製した日付、作製者、コームの数などを書いておくと便利。

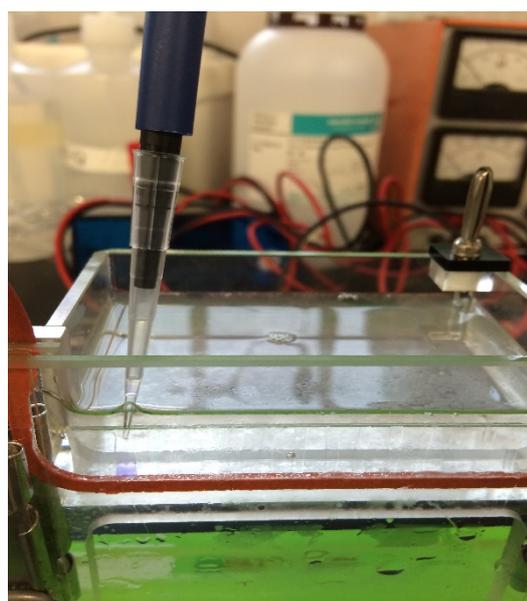
### 2.2.3 電気泳動

<準備>

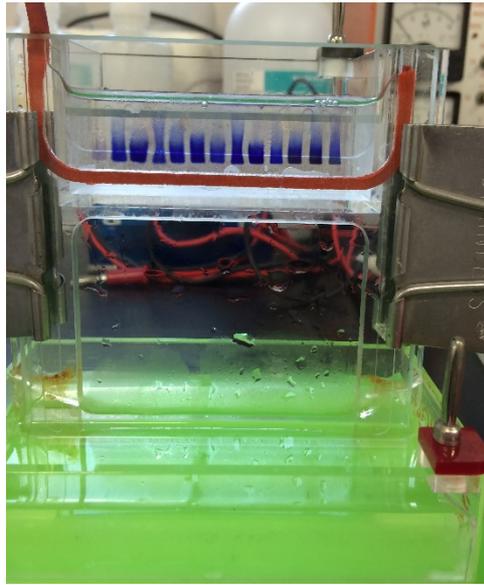
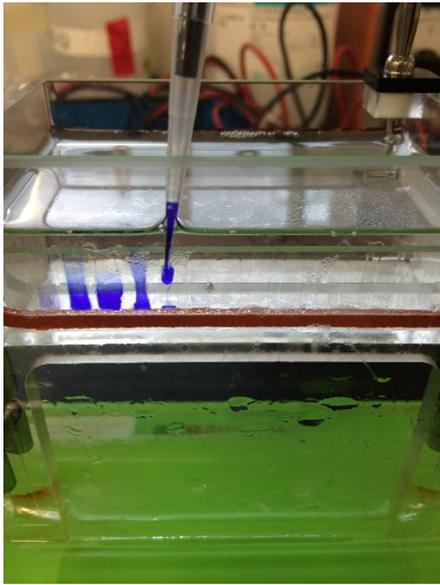
- ・泳動用 Buffer
- ・泳動装置
- ・ゲル板
- ・マーカー
- ・サンプル
- ・電流計



(1)電気泳動の装置を組み立てる。  
泳動装置に正方形のガラス板を表側にし、  
クリップで両側をとめる。  
装置の上と下に泳動用の Buffer を入れる。



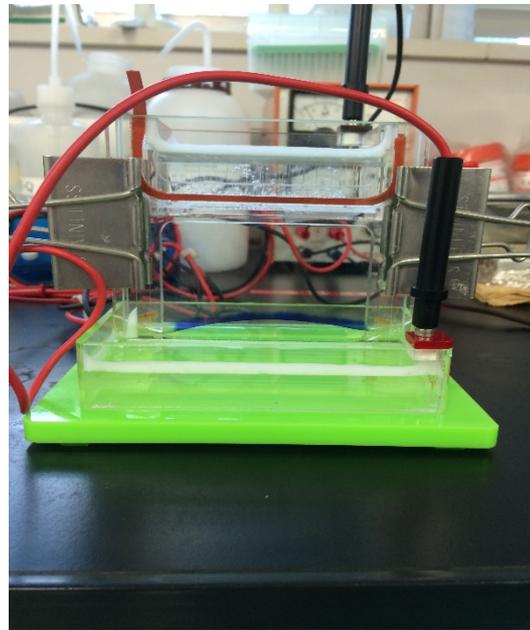
(2)分子量マーカーを左側に流す。  
\*チップの先端をできるだけ、ゲルレーン  
の下にあててやるとやり易い。



(3) サンプルの試薬も(2)と同様にいれていく。  
装置の上にした泳動 Buffer でチップを  
ピペティングするので、チップは交換し  
なくてもよい。



(4) POWER を CC にあわせて、  
mA を 200 にあわせる。1 枚のゲルにつき  
電流を 25mA 流すので、OUTPUT CONTROL  
で 25mA にあわせる。



(5) 泳動が終わるまで、50 分程まつ。



(6)泳動がおわったらクリップをはずし、ガラス板のまま水道水で洗う。



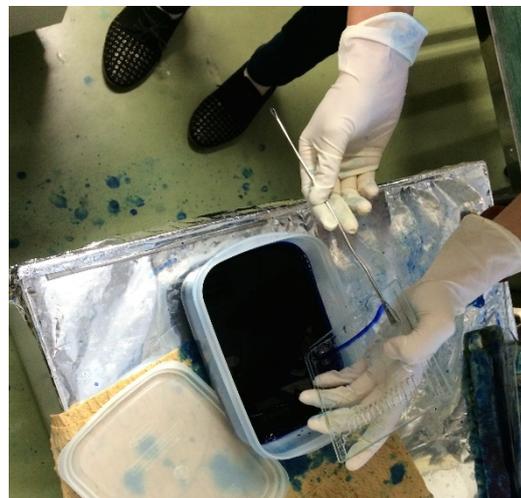
(7)泳動装置も水道水で洗ったあと RO 水でも洗う。

\*電極の部分はさびやすいので、しっかり RO 水でゆすぐ。

### 2.2.3 染色・脱色



(1)タッパーにゲルが浮くくらいの染色液をいれる。



(2)スパチュラでガラス板をはずし、正方形のガラス板の出っ張りに沿ってゲルに切り込みをいれ写真のようにゲルの下側にスパチュラをもぐらせてタッパーの中にゲルをいれる。

\*ガラス板の間に平らな面のスパチュラを入れると簡単にガラス板をはずせる。



(3)電子レンジで約3分温める。  
\*染色液が沸騰するのが目安



(4)染色液をスポイトでゆっくり、染色液後ボトルに戻して、ゲルを水道水で洗う。  
\*手を介して水をタッパーの中に入れる。



(5)ゲルを指で押さえて水をすてる。  
(4)、(5)を3回程繰り返す。



(6)脱色液をゲルが浮くくらい入れる。



(7)電子レンジで約3分温める。



(8)キムワイプをタッパーの端につめておく。

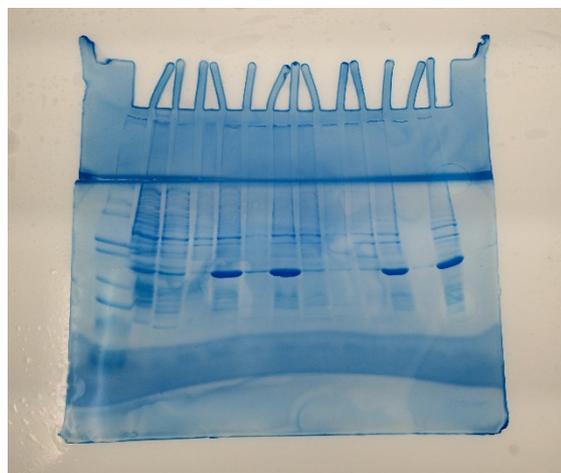
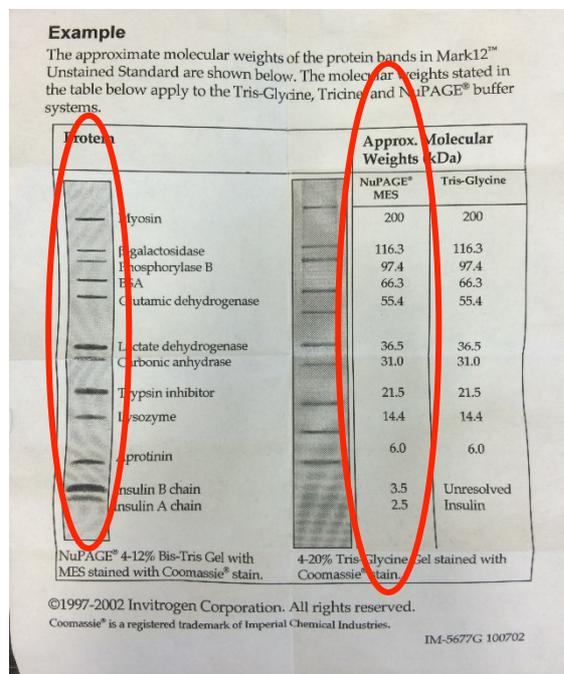


(9)ゲルを浸透器にかける。  
30分程で結果がみえてくるが、12時間程かけておくと綺麗に仕上がる。



(10)脱色液を戻し、タッパーに水道水をいれ、保管しておく。

## 2.2.4 分子量検討



目的のタンパクの発現を分子量マーカーで確認・検討する。

### 3. 補足説明

#### 3.1 ゲル板の試薬の分量 (1枚あたり)

| <1 sheet>   |         |             |
|-------------|---------|-------------|
| separating  |         | stacking    |
| 3.0ml       | 30% a.a | 0.8ml       |
| 2.0ml       | BufferD | -           |
| -           | BufferE | 0.5ml       |
| 1ml         | MilliQ  | 1.2ml       |
| 60 $\mu$ l  | 10% APS | 24 $\mu$ l  |
| 4.2 $\mu$ l | TEMED   | 2.4 $\mu$ l |

#### 3.2 ゲル板を作るときに使用する Buffer の組成について

BufferD: 1.125M Tris-HCl(pH8.8) ,0.3%SDS,39%グリセロール

100ml 生成するとき

13.63g の Tris,39ml のグリセロールに MilliQ を加え 90ml にメスアップする。

conc.HCl で pH を 8.8 に合わせてから、10%SDS (3ml) を最終濃度 0.3%となるように加えて 100ml にメスアップする。

BufferE:0.5M Tris-HCl(pH6.8),0.5%SDS

100ml 生成するとき

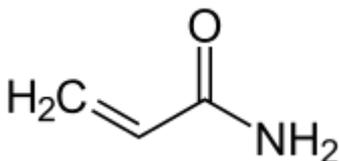
6.0g の Tris に MilliQ を加え 90ml にメスアップする。

conc.HCl で pH を 6.8 に合わせて、0.5gSDS を加えて 100ml にメスアップする。

#### 3.3 アクリルアミド:アクリル酸を母体とするアミドの一種。

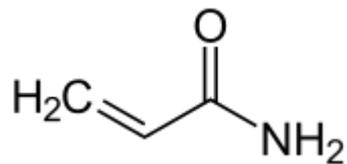
劇物指定されとり、皮膚や粘膜から吸収されるため取り扱いには気を付ける。

$\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$  (分子量 71.08)



ビスアクリルアミド: (N,N'-メチレンビスアクリルアミド)

アクリルアミドの架橋剤として混合することで、重合反応が起き網目構造を形成する。  
網目の大きさはアクリルアミドの濃度で変わり、ゲルの強度はビスアクリルアミドの割合で変わる。  
単体としては有害有機物である。



#### 参考文献

1. 濃縮ゲルだヨ！タンパク集合 (2011)  
福田青郎
2. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (2008)  
日本蛋白質科学会. 恩田真紀
3. 東京化成工業株式会社  
(<http://www.tcichemicals.com/ja/jp/index.html>)

140815 初稿 by 橋場美侑