

電気泳動 ～ゲルの染色～

2016年9月30日

1. 概要

電気泳動はタンパク質固有の電荷や分子量の違いを利用して、電気で各分子を分離する手法です。一般的にアクリルアミドなどから成る透明のゲルを使ってタンパク質のバンドを分離しますが、そのままではバンドを確認することはできません。そこで、クーマジープリアントブルーなどの色素染色や、写真現像の原理を応用した銀染色などによりバンドを視覚化し、分子量の概算や発現量の比較などを行います。今回はアトーの製品を使用したゲル染色についてご紹介します。

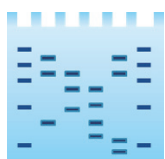
2. クーマジープリアントブルー (CBB) 染色

CBB 染色は安価で簡便な方法であり、定量的に染色されるため、もっともよく使用されるゲル染色法の一つです。検出限界は 10 ~ 100ng/バンドです。染色原理は色素とタンパク質のアミノ基が電気的に結合したり、非共有的にファンデルワールス力により相互作用することによるといわれています。アトーの *EzStain AQUA* はアルコールや酢酸を使用せず、脱色には蒸留水が使用できるため、簡便なうえに環境に配慮した染色方法です。検出感度も一般的な CBB 染色法と比べて 3 ~ 5 倍高く、バンド以外の部分が染色されにくいいため、短時間でバンドを確認することができます。

2-1. 実験方法

実験材料： 電気泳動後のゲル
EzStain AQUA (AE-1340)
蒸留水、容器、電子レンジ等

電気泳動



EzStain AQUA で染色する場合は、目的タンパク質のバンドが数十 ng 以上になるように、アプラインするタンパク質量を調整します。電気泳動後のゲルは放置せず、直ちに染色液に浸漬します。低分子を染色する場合は固定液 (40% メタノール、10% 酢酸溶液) で 30 分以上固定してしてください。

ゲル染色



EzStain AQUA をゲルサイズよりも大きいタッパーに注ぎ、電気泳動後のゲルを溶液に浸漬します (~ 50mL/ゲル)。室温で 3 時間以上染色します。

※迅速染色する場合は、電子レンジで 30 ~ 60 秒 (40℃くらいになるまで) 温めます。室温で 30 分以上染色します。

ゲル脱色



EzStain AQUA を廃棄し、蒸留水で 2 回すすぎます。新たに十分量の蒸留水を添加して脱色します (~ 100mL/ゲル)。

※迅速脱色する場合は、電子レンジで 30 ~ 60 秒 (40℃くらいになるまで) 温めます。室温で 30 分以上脱色します。

3. 銀染色

銀染色法は呈色法では最も感度よくタンパク質を染色する方法です。一般的に検出限界は 100pg ~ 1ng/バンドです。検出感度は優れていますが、ゲル表面のタンパク質だけが染色されるうえに、すぐに染色が飽和するため定量性が乏しいといわれています。タンパク質の固定にグルタルアルデヒドを使用すると、染色途中でタンパク質が修飾されてしまうため、質量分析等には適しません。アトーの *EzStain Silver* は試薬調整が容易なうえに、約 1 時間で染色操作が終了する迅速で簡便な方法です。DNA の染色にも使用でき、もちろん質量分析にも適した染色方法です。

3-1. 実験方法

実験材料： 電気泳動後のゲル
EzStain Silver (AE-1360)
メタノール、酢酸、蒸留水
マイクロピペット、メスシリンダー、容器等

試薬調整



下記 4 種類の試薬を調整します (即時調整)。S-1 ~ 4 溶液は *EzStain Silver* に付属の試薬です。発色液は 200mL、それ以外は 100mL 必要です。

固定液： 1% S-1 溶液、50% メタノール、10% 酢酸
染色液： 1% S-2 溶液
発色液： 1% S-3 溶液、1% S-4 溶液
停止液： 1% 酢酸

ゲル固定



電気泳動後のゲルを固定液に浸漬し、10 分間インキュベーションします。

※ *EzStain Silver* で検出する場合は、目的タンパク質のバンドが数百 pg 以上になるようにします。

ゲル洗浄



固定液を廃棄し蒸留水で 10 分間 × 2 回、洗浄します。

※サンプルバッファーに DTT が添加されている場合は、蒸留水の代わりに 30% メタノール溶液で洗浄します。

ゲル染色



蒸留水でさらに 10 分間洗浄した後、染色液を添加し、5 分間インキュベーションします。

※染色液は重金属廃液として処理してください。ゲルが厚い場合は時間を延長します。

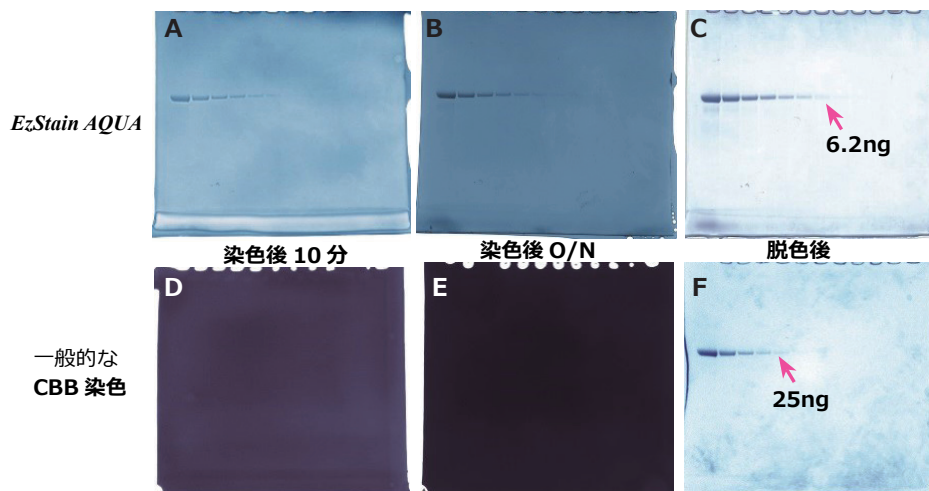
ゲル発色



蒸留水で軽くリンスした後に、発色液を半量添加して 30 秒間インキュベーションします。発色液を廃棄し、残りの発色液に置換して、発色されるまでインキュベーションします。

十分発色されたら停止液を添加して 10 分間インキュベーションし、発色を停止します。その後、蒸留水に置換します。

実験例 1 : CBB 染色法の比較



左図はヒトトランスフェリンタンパク質を 400ng/レーンからの 1/2 希釈系列で泳動し、*EzStain AQUA* および一般的な CBB 染色でゲルを染色した結果です。*EzStain AQUA* は電子レンジを使用すると、約 10 分でバンドが確認できるようになり (A)、一晩染色してもバンド以外の部分が染色されないため、脱色なしでバンドを確認できます (B)。さらに脱色後は一般的な CBB 染色法の検出限界が 25ng/レーン (C) なのに対し、その約 1/4 の 6.2ng/レーン (D) まで検出することができます。一方、一般的な CBB 染色法は染色後 10 分ではバンドが確認できず (E)、一晩染色するとバンド以外の部分も一様に呈色されるため、やはりバンドを確認できません (F)。このように *EzStain AQUA* は、簡便な使用方法である上に、迅速にかつ感度よくバンドを検出できるエコロジーな CBB 染色液です。

4. リバース（ネガティブ）染色

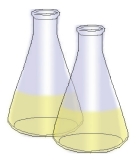
リバース染色法はタンパク質のバンドは透明なままで、バンド以外のゲル部分（バックグラウンド）が白く染色される検出方法です。検出限界は1～10ng/バンドです。ゲル内のSDSなどの塩と染色液中の金属イオンが結合して沈殿するため、タンパク質バンド以外の部分が白濁します。タンパク質自体は染色の影響をほぼ受けません。

アトーの *EzStain Reverse* は試薬調整が容易なうえに、約30分間で染色操作が終了する迅速で簡便な方法です。DNAの染色にも使用でき、もちろん質量分析にも適した染色方法です。

4-1. 実験方法

実験材料： 電気泳動後のゲル
EzStain Reverse (AE-1310)
メタノール、蒸留水
メスシリンダー、容器等

試薬調整



下記4種類の試薬を調整します（即時調整）。R-1、R-2溶液は *EzStain Reverse* に付属の試薬です。

前処理液：10% メタノール/100mL
染色液：10mL R-1 溶液 +50mL 蒸留水
発色液：10mL R-2 溶液 +50mL 蒸留水

ゲル前処理



電気泳動後のゲルを前処理液に浸漬し、5分間インキュベーションします。

ゲル染色



蒸留水で30秒間洗浄した後に、染色液を添加し、10～15分間インキュベーションします。

※染色液は重金属廃液として処理してください。ゲル濃度が高い場合は染色時間を延長します。

ゲル発色



蒸留水で30秒間洗浄した後に、発色液を添加して1～3分間インキュベーションします。

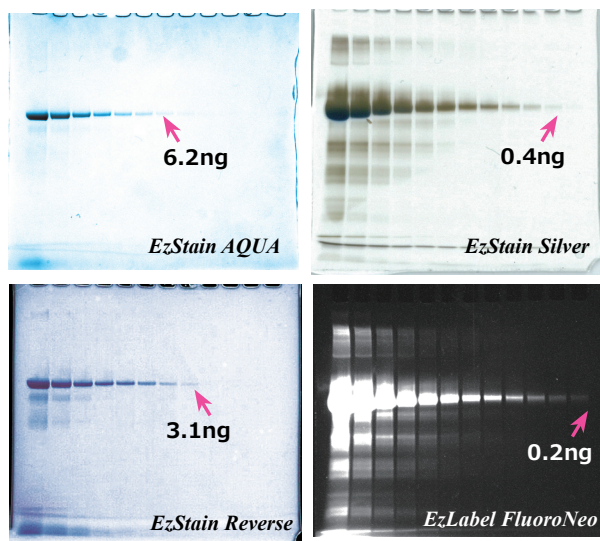
※黒い紙の上などで発色するとバンドが見やすくなります。

染色停止



発色液を廃棄し、蒸留水を添加して2分間×2回インキュベーションし、発色を停止します。

実験例2：染色法の比較



左図はヒトトランスフェリンタンパク質を400ng/レーンからの1/2希釈系列で泳動し、アトーのゲル染色試薬で染色した結果です。EzLabel FluoroNeoはサンプル調整時に蛍光標識しており、ゲル染色はしていません。このようにゲルの染色方法により、検出感度が異なります。

一般的なゲル染色方法

電気泳動ゲルを染色する一般的な試薬の組成です。より再現性良く、簡便に実験を行う際はアトーのゲル染色試薬をご利用ください。

【CBB染色】

染色液：0.25% Coomassie Brilliant Blue, 40% メタノール, 7% 酢酸
脱色液：40% メタノール, 7% 酢酸

- ① 電気泳動後のゲルを染色液に浸漬し、4時間以上（～O/N）インキュベーションする。
- ② 脱色液に置換し、数回交換しながら脱色する。

【銀染色】

Blum et al. (1987) *Electrophoresis* 8, 93-99.

固定液：40% メタノール, 10% 酢酸
洗浄液：30% エタノール
前処理液：0.02% チオ硫酸ナトリウム
染色液：0.1% 硝酸銀
発色液：3%炭酸ナトリウム, 0.05% ホルムアルデヒド
停止液：3% 酢酸

- ① 電気泳動後のゲルを固定液に浸漬して1時間以上インキュベーションする。
- ② 洗浄液で20分間×2回洗浄する。
- ③ 蒸留水で20分間洗浄する。
- ④ 前処理液で1分間インキュベーションする。
- ⑤ 染色液で20分間インキュベーションする。
- ⑥ 蒸留水で20分間×3回洗浄する。
- ⑦ 発色液で3～5分間インキュベーションする。
- ⑧ 蒸留水で洗浄した後に、停止液で5分間インキュベーションする。

【リバース染色】

Ortiz, M. L. et al. (1992) *FEBS Vol.* 296, 300~304

染色液：0.2 M イミダゾール, 0.1% SDS
発色液：0.3 M 硫酸亜鉛

- ① 電気泳動後のゲルを染色液に浸漬し、15分間インキュベーションする。
- ② 発色液に置換し、30～45分間インキュベーションする。

関連製品

AE-1340/1340L *EzStain AQUA*

ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のタンパク質検出用 CBB 染色溶液です。酢酸・アルコールフリーで水の脱色で鮮やかなブルーのバンドが感度よく得られます。

キットの内容： AE-1340 1 L
AE-1340L 5 L

AE-1360 *EzStain Silver*

ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のタンパク質・DNA 検出用の銀染色（シルバーステイン）キットです。簡単な調製で短時間・高感度にタンパク質やDNAを検出します。MS（質量分析）への利用も可能です。

キットの内容： S-1（チオ硫酸ナトリウム） 50 mL
S-2（硝酸銀） 50 mL
S-3（水酸化ナトリウム） 50 mL
S-3（ホルムアルデヒド） 50 mL

AE-1310 *EzStain Reverse*

ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のタンパク質検出用リバース染色キットです。バックグラウンド白濁させタンパク質のバンドを検出するネガティブ染色です。

キットの内容： R-1（ホウ酸） 500 mL
R-2（硫酸亜鉛） 500 mL

WSE-7010 *EzLabelFluoroNeo*

電気泳動（SDS-PAGE）用の試薬調製をしながらタンパク質・ポリペプチドに蛍光標識（ラベル化）をする試薬キットです。

キットの内容： Sample buffer 12mL (5x)
Labeling reagent 10 mg
Reducing agent 0.3 g
MW Marker 0.6 mL
RIPA Lysis buffer 10 mL

※アトー HP「実験のコツ」ページより「初めての電気泳動タンパク質のPAGE」など様々な電気泳動関連の技術資料がダウンロードできますので、ご覧ください。http://www.atto.co.jp/



アトー株式会社

■本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2
TEL(03)5827-4861 FAX (03)5827-6647
■大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1
TEL(06)6136-1421 FAX (06)6356-3625

■URL <http://www.atto.co.jp/>