

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 ～基本操作～

2023年4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、電気によって各分子を分離する手法です。最もよく使用される SDS-PAGE (SDS Polyacrylamide gel electrophoresis) は、タンパク質に SDS を付加して負に帯電させ、アクリルアミドゲルのメッシュ構造を利用して、タンパク質の分子量の違いでふるい分けします。今回はアトーの製品を使用した SDS-PAGE 用の基本操作に関してご紹介します。

2. 実験の流れ

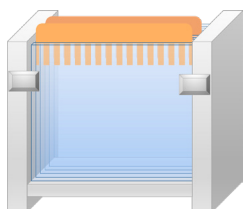
サンプル調整



細胞や組織などから RIPA や SDS サンプルバッファーでタンパク質を抽出し、SDS 処理および還元処理を行います。

タンパク質抽出・処理液
EzSubcell series, EzApply
ブロックインキュベータ
MyMini Block

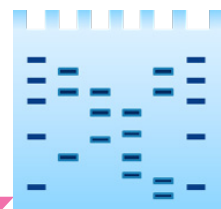
ゲルの作製



目的タンパク質の分離に適したアクリルアミドの濃度のゲルを作製します。既製ゲルを使用すると、より迅速に、精度・再現性の高い実験を行うことができます。

ゲルバッファー
EzGel Ace, EzGel Sep, EzGel Stack
ゲル作製器
多連ミニゲル作製器

電気泳動



SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりタンパク質を分離します。目的タンパク質により、アクリルアミドの濃度を変えます。

ゲル・電極バッファー
ePAGE HR, EzRun
電気泳動槽・パワーサプライ
Pagerun-Ace, MyPower

ゲルの染色



泳動後のゲルを CBB 染色、もしくは銀染色します。あるいはウエスタンブロットリング等の様々な実験に適した処理を行います。

ゲル染色液
EzStain AQUA/Silver/Reverse
シェーカー
SeesawShaker atto

3. 機器・試薬・材料

- 細胞・組織サンプル等 (例: Hela細胞)
- EzApply/EzLabel FluoroNeo・・・タンパク質抽出・処理液
- e-PageL-HR・・・プレキャストゲル
- EzRun/EzRun MOPS・・・電極バッファー
- MyMini BLOCK・・・ヒートブロックインキュベータ
- Rapidus Mini/PageRun/Compact PAGE・・・電気泳動槽
- MyPower・・・パワーサプライ
- トレイ (ゲルサイズより一回り大きいもの)
- SeesawShaker atto・・・シーソーシェーカー

《自作ゲルを作製する場合》

- EzGel Ace/EzGel Stack/EzGel Sep・・・ゲル緩衝液
- アクリルアミド/ビス混合液・・・アクリルアミドモノマー
- APS (過硫酸アンモニウム)・・・重合開始剤
- TEMED (N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン)・・・重合促進剤
- 蒸留水
- ゲル作製器/多連ゲル作製器
- ゲルプレート
- コウム
- スペーサー

4. 実験方法

4-1. サンプル調整

《通常の電気泳動サンプル》

- ① 50 μ L のサンプルに 50 μ L の EzApply (2 \times 濃度、キット添付 DTT 溶解済み) を加えて混合します。
- ② MyMiniBlock で 95 $^{\circ}$ C 5 分間加熱します (煮沸でも OK)。
- ③ 15,000rpm で 5 分間遠心し (しなくても OK) 上清を回収します。
※作製したサンプルは -20 $^{\circ}$ C で保存可能です。
※ EzApply の代わりに SDS Gel Loading Buffer (5x 濃度) を使用することも可能です。

《蛍光ラベル電気泳動サンプル》

- ① EzLabel FluoroNeo を使用します。40 μ L のタンパク質サンプルにキット添付の 10 μ L の Sample buffer (5x conc.) と Labeling reagent を 0.5 μ L 添加して混合します。
- ② MyMiniBlock で 95 $^{\circ}$ C 3 分間加熱します (煮沸でも OK)。
- ③ ②の混合液に Reducing agent (DTT) を 2 μ L 添加して混合します。
- ④ MyMiniBlock で 95 $^{\circ}$ C 3 分間加熱します (煮沸でも OK)。
※作製したサンプルは -20 $^{\circ}$ C で遮光保存可能です。

4-2. ゲルの作製

- ① 自作ゲルを作製する場合は下記 A ~ D の試薬が必要になります。

(A) アクリルアミド / ビス溶液

アクリルアミド / ビス混合溶液は分画分子量範囲に応じて、一般的に 19:1、29:1、37.5:1 の架橋率の溶液が使用されます。架橋率が高い溶液ほど低分子量側の、また架橋率が低いほど高分子量側の分画範囲が広がります。目的分画範囲に応じて下記の例を参考に選択・ご準備ください。

《30(w/v)% アクリルアミド / ビス (29:1) 溶液》

29 g のアクリルアミドと 1 g の N,N'-メチレンビス (アクリルアミド) を秤量し、50 mL の蒸留水に溶解します。溶解後、蒸留水で 100 mL にメスアップします。

※アクリルアミドのモノマーには神経毒性があります。取扱う場合には手袋など身体の保護を行ってください。

※アクリルアミド / ビス溶液は 30(w/v)% アクリルアミド / ビス (29:1) 溶液 や 30(w/v)% アクリルアミド / ビス (37.5:1) 溶液などが市販されています。架橋率が高い (ビスの割合が多い) と、架橋構造が増え格子構造が密になった硬いゲルができ、より低分子量領域の分画が明瞭になります。

(B) ゲル緩衝液

《EzGel Ace》 中性のゲル緩衝液であり、濃縮および分離ゲルに使用できます。作製したゲルは長期冷蔵保存可能 (約 1 か月) です。

《EzGel Stack》 Laemmli 法に準拠した濃縮ゲル用緩衝液です。0.5 M Tris-HCl (pH6.8) 相当のバッファーです。

《EzGel Sep》 Laemmli 法に準拠した分離ゲル用緩衝液です。1.5 M Tris-HCl (pH8.8) 相当のバッファーです。

※ゲル緩衝液には EzGel Ace 単独、もしくは EzGel Stack と EzGel Sep の組み合わせでご利用ください。

(C) 10% APS (過硫酸アンモニウム)

0.1 g の APS を秤量し、1 mL の蒸留水に溶解します。

※ 10% APS は徐々に活性が落ちるため、要時調整することをお勧めします。冷蔵庫で 1 週間位保存可能です。

(D) TEMED (N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン)

原液をそのまま使用します。

主な電気泳動用試薬の組成

電気泳動で使用する主な試薬の組成です。より再現性良く、簡便に実験を行う際はバジエルなどの既製ゲルやアトー試薬をご利用ください。

サンプルバッファー (5x): 250mM Tris-HCl (pH6.8)、8% SDS、0.1% Bromophenol blue、40% Glycerol、100 mM DTT

濃縮ゲル緩衝液: 0.5 M Tris-HCl (pH6.8)

分離ゲル緩衝液: 0.5 M Tris-HCl (pH6.8)

アクリルアミドストック溶液: 30% Acrylamide/N,N'-methylene-bis acrylamide (29:1)

泳動用緩衝液: 25mM Tris、192mM Glycine、0.1% SDS

CBB 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

② ゲル溶液の調整をします。

ゲル組成表 (下表) に従い、分離ゲルと濃縮ゲルのゲル溶液を作製します。

※ APS と TEMED 以外の溶液を混合します。

ゲル濃度	分離ゲル				濃縮ゲル
	7.5%	10%	12.5%	15%	4.5%
蒸留水	5 mL	4.2 mL	3.3 mL	2.5 mL	3 mL
A.A	2.5 mL	3.3 mL	4.2 mL	5 mL	0.75 mL
ゲル緩衝液	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	1.25 mL
10% APS	0.075 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL	0.05 mL
TEMED	0.005 mL	0.005 mL	0.005 mL	0.005 mL	0.003 mL

※上表は1枚のミニゲルサイズに必要な容量です。

③ 分離ゲル溶液に APS と TEMED を添加し、泡立てないように混合し、ゲルプレートに分離ゲル溶液を流し込みます。

※泳動槽およびゲル作製器の使用方法は各製造メーカーにお問い合わせください。

④ 界面を乱さないように気をつけながら、蒸留水を重層します (0.2 ~ 1.0 mL)。

※アクリルアミドは酸素があると重合しにくいので、蒸留水を重層することで空気中の酸素を遮断します。

⑤ 室温で 30 分以上静置して重合します。

※ゲルの界面が明瞭に見えることを確認してください。重合時間は季節や室温によって変わります。20℃以下では重合しにくくなるので、ご注意ください。

⑥ 重層した蒸留水をペーパータオルなどに吸わせて完全に除きます。

⑦ 濃縮ゲル溶液に APS と TEMED を添加して泡立てないように混合し、分離ゲルの上に濃縮ゲルを重層します。

⑧ コウムを差し込み、室温で 30 分以上静置して重合します。

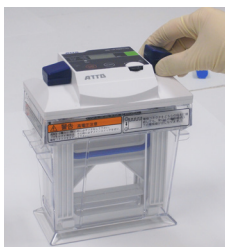
※ EzGelAce を使用して作製したゲルは、ラップ等で包み、蒸留水で 4 倍希釈した EzGelAce を約 5mL (ゲル一枚当たり) 入れたハイブリック等に密閉して冷蔵庫で約一か月保存可能です。Laemmli 法のゲルバッファーで作製したゲルは保存できませんので、即日ご使用ください。

4-3. 電気泳動

① 泳動層の下部槽に十分量の電極液を入れます。

※電極液が不足すると泳動パターンが乱れる原因になります。

② 自作ゲルもしくは既製ゲル (e-PAGE-HR) を PageRun-Ace (電源付電気泳動装置) に、ゲル下端に空気が入らないように注意しながらセットします。



③ 上部槽に十分量の電極液を入れます。

④ 1レーンあたり 5 ~ 10 μL のサンプルをアプライします。

※サンプル濃度は精製タンパク質では 100ng ~ 1 μg/lane、抽出液では 1 ~ 50 μg/lane が適当です。

⑤ スタートボタンを押して電気泳動を開始します。

※ High mode (24W) で 35 分、もしくは Standard mode (20mA/gel) で約 80 分間泳動します。

4-4. ゲル染色

① ミニゲル 1 枚当たり 30 ~ 50mL の EzStain AQUa をゲルよりもひと回り大きなタッパーに注ぎます。

② 電気泳動直後のゲルを EzStain AQUa に浸漬し、室温で 3 時間 ~ 1 晩振とうしながら染色します。

※高濃度のタンパク質染色には長時間を必要とします。

※電子レンジを使用すると迅速に染色できます。

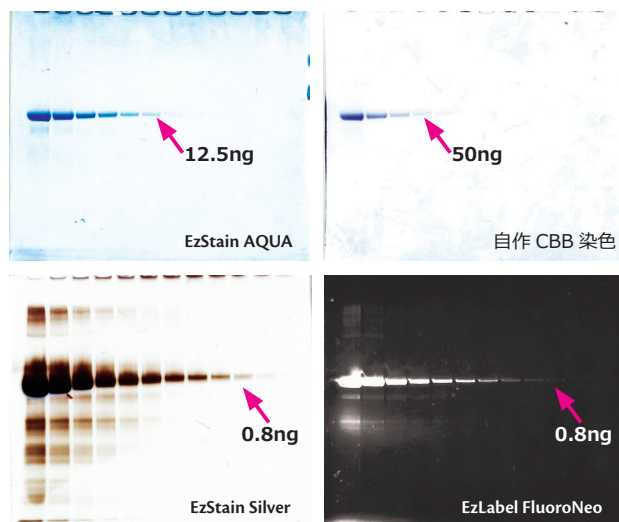
③ タンパク質バンドが十分染色できたのを確認した後、EzStain AQUa を廃棄し、蒸留水でゲルを軽くすすぎ、新たに十分量の蒸留水を加えて脱色します。途中、何度か蒸留水を交換し、バックグラウンドが透明になるまで脱色します。

※色素廃液として適切な処理をお願い致します。

※電子レンジを使用すると迅速に脱色ができます。

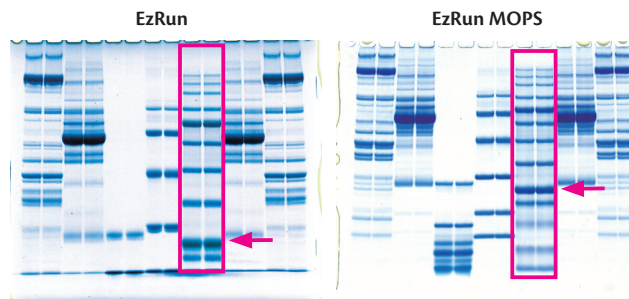
※ 自作の CBB 染色液 (前述) を使用する際は、染色は 6 時間以上、脱色は専用の脱色液 (前述) で 4 ~ 6 時間以上行ってください。また自作の CBB 染色液は EzStain AQUa よりも検出感度が低いため、サンプル量にご注意ください。

実験例 1 : 染色方法の違い



上図はトランスフェリンタンパク質を EzApply もしくは EzLabel FluoroNeo を使用して電気泳動サンプルを作製した後に、レーン当たり 400ng からの 1/2 希釈系列で泳動した結果です。電気泳動後のゲルは EzStain AQUa、自作 CBB 染色液、および EzStain Silver で染色しました。EzLabel FluoroNeo サンプルは泳動後のゲルを CyanoView (Cyan 透過光源) で励起し、540 nm LP フィルターを用いて 0.5 秒間の露光時間で Luminograph により撮影した結果です。自作 CBB 染色液よりも EzStain AQUa は検出感度が高く、また EzLabel FluoroNeo は銀染色と同等以上の検出感度を示しました。EzLabel FluoroNeo は染色時間が不要であり、撮影後のゲルはウエスタンブロット等の解析にも使用できるため、短時間で効率よく実験を行うのに適しています。一方、染色後のゲルはウエスタンブロット等への解析には適しません。染色方法は実験目的や検出感度に合わせてを選択してください。

実験例 2 : 泳動バッファーの違い



上図は様々なタンパク質を同じアクリルアミド濃度の 10% ePage-HR を使用し、泳動バッファーが異なる条件、EzRun (左) と EzRun MOPS (右) で電気泳動した結果です。四角で囲った部分は、両方とも分子量マーカーである EzProteinLadder を泳動したレーンですが、EzRun では 10 本のバンドが検出されたのに対して、EzRun MOPS では 13 本のバンドが検出されており、低分子量側のタンパク質も分離できることが示されました。つまり泳動バッファーを EzRun MOPS に変えるだけで、10%の濃度均一ゲルが、まるで濃度勾配ゲルのようなバンドパターンを示すようになったのです。このように泳動バッファーを変えることで、同じアクリルアミド濃度のゲルを使用しても、タンパク質の分離範囲を変えることができます。

※ 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、ご一読ください。 <https://www.atto.co.jp/>

アトー株式会社

ATTO

■ 東京本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2
 ☎ (03)5827-4861 ☎ (03)5827-6647

■ 大阪支店 〒530-0044 大阪府北区東天満2-8-1 若杉センタービル別館 5F
 ☎ (06)6136-1421 ☎ (06)6356-3625

■ メンテナンスサービス 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6
 ☎ (03)5818-7567 ☎ (03)5818-7563