

電気泳動 ～ポリアクリルアミドゲルの調製～

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、電気で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ポリアクリルアミドゲルの調製方法に関してご紹介します。

2. 実験の流れ

プレート組立



必要なゲルの枚数に応じて、自作ゲル作製キットもしくは多連ゲル作製器を組み立てます。

ゲル作製器
自作ゲル作製キット
多連ミニゲル作製器

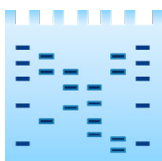
ゲルの調整



ゲルの調製に必要な試薬の準備をします。ゲル溶液は作製直前に混合します。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。

ゲルバッファー
EzGel Ace, EzGel Sep, EzGel Stack

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ってサンプル調製方法、泳動バッファーを選択します。

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

(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、要時調製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。

SDS 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

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

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

(SDS を除いた上記泳動バッファーは Native PAGE で使用可能です)

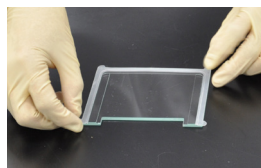
CBB 染色液: 0.25% Coomassie Brilliant Blue, 40% メタノール, 7% 酢酸

脱色液: 40% メタノール, 7% 酢酸

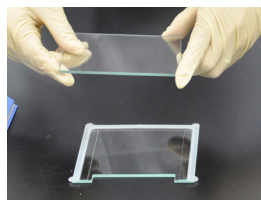
3-2. プレーートの組み立て

アトー製の AE-6401 ミニスラブゲル作製キットを使用して、ゲルを調製する方法をご紹介します。

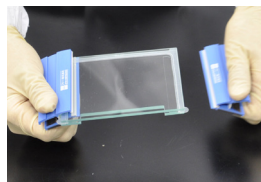
操作動画



スパーサーを上面にしてノッチ泳動プレートをおきます。泳動プレートの上端と、シールガスケットの上端の位置をそろえます。スパーサーとシールガスケットが重なり合わないようになります。



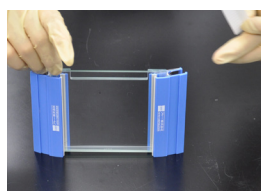
ブレン泳動プレートとノッチ泳動プレートを、シールガスケットがずれないように注意しながら重ねます。



泳動プレート下端から約 5mm 上の位置で、マグネクリップミニをはさんで固定します。プレートおよびガスケットがずれないように注意します。



分離ゲルを注入するときの目印として、コウムの先端から約 5mm 下に油性ペンで目印を付けます。



コウムを外し、泳動プレートセットを水平な実験台上に垂直に立てます。プレートが水平になるように、クリップの位置を調整します。

3. 実験方法

3-1. 機器・材料およびストック試薬

- 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
- スパーサー

ストック溶液

(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、19:1、29:1、37.5:1 など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。

(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 の組み合わせでご使用ください。

② ゲル溶液の調製をします。

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。

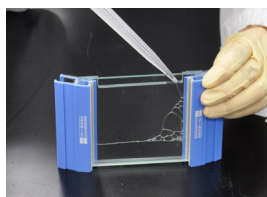
※ APS と TEMED 以外の溶液を混合します。

ゲル濃度	分離ゲル				濃縮ゲル
	7.5%	10%	12.5%	15%	
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

※ A.A は 30% アクリルアミドです。

※ 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。



分離ゲル溶液を泳動プレートの切り欠きの部分から静かに注ぎ入れます。勢いよく注ぐと重合ムラが生じる要因になります。分離ゲル溶液は、目印の高さまで注いでください。

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。

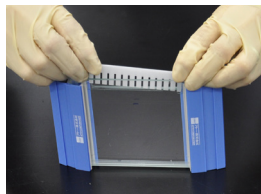
⑤ 室温で 30 分以上静置して重合します。

※ 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。

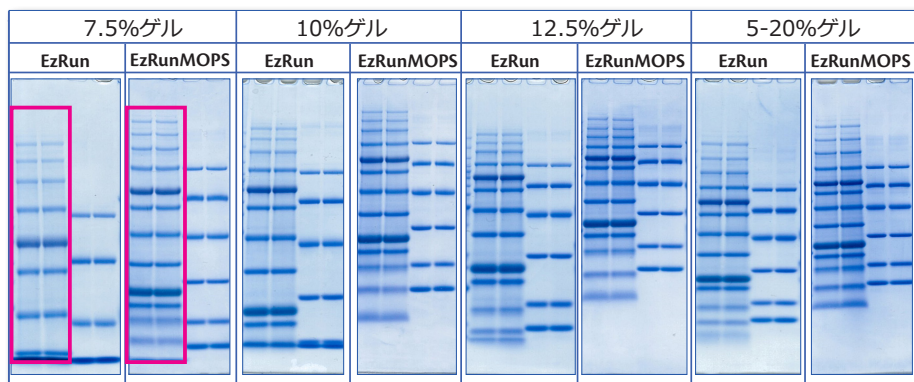
⑧ コウムを差し込み、室温で 30 分以上静置して重合します。



コウムは水平になるように差し込み、コウムのウェル部分に空気がつかないように注意します。

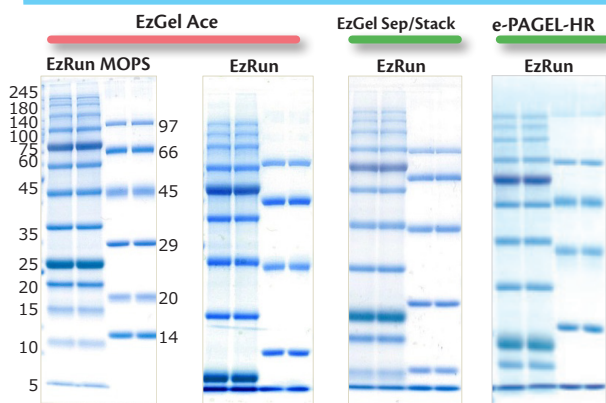
※ EzGelAce を使用して作製したゲルは、ラップ等で包み、蒸留水で 4 倍希釈した EzGelAce を約 5mL (ゲル一枚当たり) 入れたハイブリック等に密閉して冷蔵庫で約一か月保存可能です。Laemmli 法のゲルバッファーで作製したゲルは保存できませんので、即日ご使用ください。

実験例 1：アクリルアミド濃度と泳動バッファーの影響



左図は分子量マーカータンパク質を様々なアクリルアミド濃度のポリアクリルアミドゲルを使用し、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。例えば 7.5% 濃度のゲルを用いて分離した結果 (左端カラム) をみると、EzProtein Ladder のパターン (各ゲルの右側 2 レーン) が、EzRun では 8 本のバンドが検出されたのに対して、EzRun MOPS では 12 本のバンドが検出されています。このように EzRun MOPS を使用すると、低分子量側の分離範囲が広がり、より明瞭に分離できるようになります。

実験例 2：ゲルバッファーおよび既製ゲルとの比較



左図は分子量マーカータンパク質を 10% アクリルアミド濃度のポリアクリルアミドゲルを使用して分離した結果です。左側 2 枚のゲルは EzGelAce を使用し、その隣は EzGel Sep および EzGel Stack を使用して自作したゲルの泳動結果です。右端のゲルは既製ゲル ePAGEL-HR を使用した泳動結果です。また EzGel Ace で自作したゲルは、異なる泳動バッファー EzRun MOPS (左) と EzRun (右) で泳動し、それ以外のゲルは全て EzRun で電気泳動しました。ゲルバッファーが異なると、同じアクリルアミド濃度のゲルでも、若干異なる移動度を示すことが判ります。また実験例 1 でも示しましたが、泳動バッファーが異なってもタンパク質の移動度は影響を受け、EzRun MOPS を使用すると低分子量側のタンパク質がより明瞭に分離できるようになります。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ります。このようにゲルバッファーや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は影響されます。

※ 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。

関連製品

AE-6530
ラビダス・ミニスラプ電気泳動槽

高速泳動対応の
電気泳動槽です。



WSE-3100
パワーステーションギブリ I

業界初!
タッチパネル式電源装置

抜群の視認性・操作性で
泳動もプロットイングもこれ 1 台



アトー株式会社

■ 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 大阪市北区東天満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

■ URL <https://www.atto.co.jp/> お問い合わせ WEB会員登録の上お問い合わせフォームより