

SDS-PAGE

Osakada

分離ゲル(ATTOミニゲル1枚分 8 ml)

	アクリルアミドの濃度			
	7.5%	10%	12.5%	15%
30% Acrylamide	2 ml	2.67 ml	3.33 ml	4 ml
2% Bis	0.8 ml	0.52 ml	0.413 ml	0.344 ml
DW	3.04 ml	2.65 ml	2.1 ml	1.5 ml
1.5M Tris-HCl(pH8.8)			2 ml	
10% SDS		80 μ l		
TEMED		4.8 μ l		
10% APS		80 μ l		

濃縮ゲル[5%](ATTOミニゲル1枚分 3 ml)

30% Acrylamide	0.5 ml
2% Bis	195 μ l
DW	1865 μ l
1M Tris-HCl(pH6.8)	380 μ l
10% SDS	30 μ l
TEMED	3 μ l
10% APS	30 μ l

4×SDS サンプルバッファー

1M Tris-HCl(pH6.8)	2.4 ml	(240 mM)
SDS	0.8 g	(8%)
Glycerol	4 ml	(40%)
Bromophenol blue	10 mg	(0.1%)
(2-Mercaptoethanol)*	(2 ml)	(20%)
DW	fill up to 10 ml	

*2-Mercaptoethanolは使用直前に加える。

泳動バッファー

Tris base	9 g	(25 mM)
Glycine	43.2 g	(192 mM)
SDS	3 g	(0.1%)
DW	fill up to 3 L	

CBB染色液

Coomassie brilliant blue R-250	0.5 g	(0.25%)
Methanol	10 ml	(5%)
Acetic acid	15 ml	(7.5%)
DW	fill up to 200 ml	

脱色液

Methanol	200 ml	(40%)
Acetic acid	50 ml	(10%)
DW	250 ml	

SDS-PAGE

1. ゲルの作製

[分離ゲルの作製]

ゲル板を組み立て(ゲル板1組、シーリング、クリップ、コーム)、コームの下端から1cmくらいのところにマジックで印をつけておく。上記の組成表に従い適当な濃度の分離ゲル溶液を調整する。このときAPS以外の試薬を混合し室温に戻しておく。APSを加えたらすぐに重合が始まるので、速やかにゲル板に予めつけた印のところまで注ぐ。空気中の酸素がゲルの重合を阻害しないように水飽和n-butanol、あるいはDWを静かに重層する。ゲルが固まり界面が明瞭に見えてくるまで30分から1時間程度静置する。

[濃縮ゲルの作製]

分離ゲルが固まったら水層を捨てDWでよく洗う。分離ゲルと同様に上記の組成表に従い濃縮ゲル溶液を調整し、その一部で分離ゲルの界面を共洗いする。ゲル板上端まで濃縮ゲル溶液を注ぎ、泡が入らないようにコームを差し込む。ゲルが固まるまで30分以上静置する。

2. サンプルの調整

サンプルの3分の1容量の4×SDSサンプルバッファーと全体の20分の1容量の2-Mercaptoethanol(終濃度5%)を加え混合する。2-Mercaptoethanolのかわりに1M DTT(終濃度 50 mM)でもよい。95°Cで5分間、加熱処理する。

3. ゲルのキャスティング

ゲル板からクリップ、シーリングとコームを外す。脱イオン水で軽く洗って泳動装置にゲル板をセットし、泳動バッファーを泳動槽の上下に入れる。この際、下の泳動槽にバッファーを入れたときに、泳動槽を傾けるかシリンジでバッファーを送るなどしてゲルの下端にたまる気泡を除く。シリンジあるいはピペットマンを用いてウェル内にバッファーを送り、アクリルアミドのモノマーやゲルかすを吹き飛ばす。

4. 電気泳動開始と終了

適当な量のサンプルを静かにアプライする。空いたレーンには1×サンプルバッファーを入れておく。電源をつなぎ、ゲル1枚につき20 mA(定電流)で泳動を開始する。色素が分離ゲルに入ったら30 mAに変える。色素がゲルの下端近くまで移動したら電流を止め、ゲル板を外す。

ゲルのCBB染色/脱色

1. プラスチック容器にCBB染色液を入れ、泳動終了後のゲルを浸し30分～2時間振盪する。

2. 染色液を回収し、脱色液でゲルを軽く洗う。新しい脱色液にゲルを浸し、明瞭なバンドが見えてくるまで最大1時間振盪する(このとき脱色液中にキムワイブを入れておくと、これに色素が吸着するので脱色が早まる)。

さらにバックグラウンドの色を抜きたい場合には、DWあるいは10% Acetic acid中で一晩振盪してもよい。この後ゲルを乾燥させて保存する場合は、水でゲル中の酢酸やメタノールを十分に置換する。

ゲルの銀染色

以下、Amersham Biosciences (現; GE Healthcare) PlusOne™ Silver Staining Kit, Proteinのプロトコールより引用。各ステップシェイカーで振とうし、以下の溶液に順次交換していく。溶液中でゲルが動いていないときれいに染色されないことがあるので注意する。

(9 cm × 6 cmのゲル1枚分)

<u>1. Fixation</u>	<u>30 min</u>	
Ethanol	20 ml	
Acetic acid	5 ml	
Make up to 50 ml with DW		
<u>2. Sensitizing</u>	<u>30 min</u>	→廃液はアルデヒド廃液入れに回収する。
Ethanol	15 ml	
*Glutardialdehyde (25%)	0.25 ml	
Sodium thiosulphate (5%)	2 ml	
Sodium acetate	3.4 g	
Make up to 50 ml with DW		
<u>3. Washing</u>	<u>3 × 5 min</u>	
DW		
<u>4. Silver reaction</u>	<u>20 min</u>	→廃液は5N NaClの入った銀廃液入れ(アルデヒド+)に回収する。
Silver nitrate solution (2.5%)	5 ml	
*Formaldehyde (37%)	0.02 ml	
Make up to 50 ml with DW		
<u>5. Washing</u>	<u>2 × 1 min</u>	
DW		
<u>6. Developing</u>	<u>2~5 min</u>	→廃液はアルデヒド廃液入れに回収する。
Sodium carbonate	1.25 g	
*Formaldehyde (37%)	0.01 ml	
Make up to 50 ml with DW		
<u>7. Stopping</u>	<u>10 min</u>	
EDTA-Na ₂ •2H ₂ O	0.73 g	
Make up to 50 ml with DW		
<u>8. Washing</u>	<u>3 × 5 min</u>	
DW		

*Glutardialdehyde、Formaldehydeは使用直前に加える。

BAF(分子量; 約10 kDa)のSDS-PAGE(上記の手順と異なる項目を示す。)

分離ゲル(ATTOミニゲル1枚分 8 ml)

アクリルアミドの濃度	15%
40% Acrylamide/Bis*	3 ml
DW	2.31 ml
50% glycerol	533 μ l
1.5M Tris-HCl(pH8.8)	2 ml
10% SDS	80 μ l
TEMED	80 μ l
10% APS	4.8 μ l

*40% Acrylamide/Bis solution(BIORAD/161-0148)

4×SDS サンプルバッファー

1M Tris-HCl(pH6.8)	2.4 ml	(240 mM)
SDS	0.8 g	(8%)
Glycerol	4 ml	(40%)
Bromophenol blue	10 mg	(0.1%)
(1M DTT*)	(0.8 ml)	(80 mM)
DW	fill up to 10 ml	

*サンプルの調整を参照

サンプルの調整

サンプルに対して0.96倍の2×SDSサンプルバッファーを加え混合する。100℃で5分間の加熱処理後、1M DTT(終濃度 20 mM)を加える。DTTを加えてから加熱処理する場合は70℃で10分間。1M DTTは使用直前に粉を溶かしたフレッシュなものを使用すること。

電気泳動

ゲル1枚につき20 mA(定電流)で泳動を開始する。色素が分離ゲルに入ったら300 V(定電圧)に変える。色素がゲルの下端近くまで移動したら電流を止め、ゲル板を外す。

Btf / EBP1(分子量; 約106 kDa)のSDS-PAGE(上記の手順と異なる項目を示す。)

電気泳動

通常、Wako / 191-07145(純度95%)のSDSで泳動バッファーを作製しているが、Btf / EBP1の場合はSIGMA / L-5750(純度72%)のSDSで作製した泳動バッファーを使用した方が良い結果が得られる。(転写はwet transfer SDS(-)で行う。7-2.immunoblotting BAFのウェスタンブロットティング参照)タンパク質によるので、通常法で転写効率が悪い場合には試してみると良い。