

[研究論文]

分離ゲルに水を重層しない SDS-PAGE ゲル調製

君島健夫¹・小澤秀夫¹¹ 応用バイオ科学科

Preparation of SDS-PAGE gel without overlaid water on separating gel

Takeo KIMIJIMA, Hideo OZAWA

Abstract

SDS-PAGE is essential for protein experiment in many laboratories. SDS-PAGE gel is constituted by separating and stacking gels. For the preparation of SDS-PAGE gel, the reagent mixture of separating gel is added between glass plates and then, usually, water is overlaid. After the polymerization of the separating gel, the water was removed and the reagent mixture of stacking gel is added. It was suggested from this study that the overlaid water was not essential for the preparation of SDS-PAGE gel.

Keywords: protein, SDS-PAGE

1. まえがき

ティセリウスは電気泳動により、各種アルブミンを分離した¹⁾。その後、タンパク質の電気泳動は、多くの改良が加えられ、現在多くの研究室では、SDS-PAGE (硫酸ドデシルナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動) が行われている²⁾。一般的に SDS-PAGE では、試料に含まれるタンパク質は、濃縮ゲル中で濃縮され、分離ゲル中で分離される。電気泳動ゲルの調製は、通常以下の通りに行われる。まず、分離ゲルの試薬混合液をゲル板に入れたのち、水を重層する。1 時間ほど放置し、分離ゲルが形成されたのち、重層した水を除き、濃縮ゲルの試薬混合液を加える。濃縮ゲルが形成され、電気泳動ゲルは完成する。上記の操作で、一般的には水を重層することが多いが、水の代わりにイソプロパノールやブタノールを重層することもある。

分離ゲルの試薬混合液を容器に加えたのちに、水を重層せず、直接、濃縮ゲルの試薬混合液を容器に加えた場合、ゲル作製時間の短縮が可能である。そこで本研究では、水を重層した場合と重層しなかった場合の電気泳動図を比較し、水の重層の有無は、ほとんど電気泳動結果に影響を与えないことを確認した。SDS-PAGE は、タンパク質の実験の中心と言っても過言ではない。そのため SDS-PAGE ゲル作製の時間短縮に関する本論文は非常に重要なものと言えるであろう。

2. 実験装置および測定方法

本実験では、EzGelAce (アトー)、電気泳動等級の 30 (w/v) %-アクリルアミド/ビス試薬混合液 (37.5:1) (ナカライテスク)、*N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン (和光純薬工業) およびペルオキオ二硫酸アンモニウム (和光純薬工業) を用い、電気泳動ゲルを作製した。分離ゲルは 12.5%、濃縮ゲルは 4.5%とした。電気泳動装置としてプレートサイズ 106 mm × 100 mm のリアルスラブゲル電気泳動装置 (BE-S21、バイオクラフト) を用いた。試料緩衝液、電極緩衝液および染色液は、それぞれ EzApply、EzRunMOPS および EzStainAqua (アトー) を用いた。電気泳動は、定電圧 (250 V) で 23 分間、行った。各操作については、試薬に記載のプロトコールに従ったが、分離ゲルを作製後、水を重層した場合と、水を重層せずに直接濃縮ゲルを加えた場合の二通りを行い比較した。

分子量マーカーは、プレジジョン Plus プロテイン未着色スタンダード #1610363 (バイオ・ラド) を用いた。シロアシエビ *Litopenaeus vannamei* に 4 倍量の 150 mM 塩化ナトリウムを含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を加え、ホモジナイズし、10 分間 100°C で加熱後、遠心分離 (10,000 ×g、10 分、4°C) を行い、得られた上清を等量の試料緩衝液と混合し、電気泳動試料とした。電気泳動試料は各レーンに 5 μL ずつアプライした。

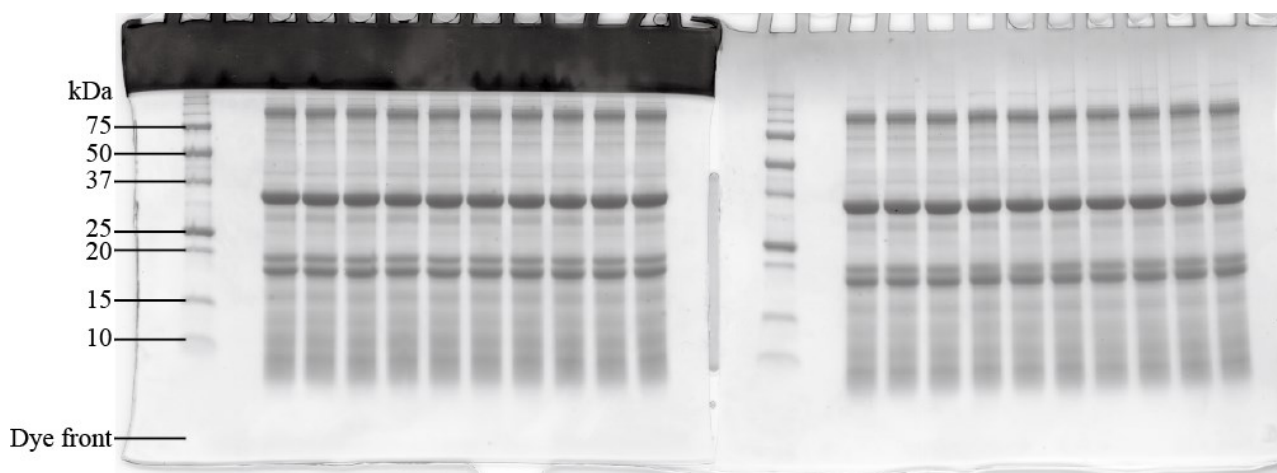


Fig. 1 SDS-PAGE pattern with (left) or without (right) overlaid water on separating gel. The left side was molecular weight marker and other lanes were shrimp *Litopenaeus vannamei* heat extract.

3. 実験結果と考察

Fig. 1の左は、分離ゲルに水を重層し作製した電気泳動ゲルを用いたときの泳動図である。右は水を重層しなかった電気泳動ゲルを用いたときの泳動図である。分子量マーカーの75 kDaより大きな3つの成分はそれぞれ、250、150 および 100 kDa である。この三つのバンドおよび75 kDaのバンドの間隔は、水を重層した場合の方が広い。また、水を重層した場合のほうが濃縮ゲルは脱色されにくい。さらに、水を重層しない場合は、濃縮ゲルの上端付近は分離ゲルと比較すると若干柔らかく、脱色もされにくいものの、濃縮ゲルと分離ゲルの間は不明瞭である。これらの結果は、濃縮ゲルと分離ゲルとの混合を示唆するものである。しかしながら、水の重層の有無は、75 kDa以下のタンパク質の分離能や移動度にほとんど影響を与えていないことが示された。従って、多くの場合において、電気泳動ゲル作製時に水を重層する必要はない。また、濃縮ゲルを用いず、分離ゲルのみで電気泳動を行った場合、ゲル上端の重合に時間がかかること、タンパク質バンドの両端がスマイルすることが確認されているため、実用的ではないと考えている。

本実験も含め、著者の研究室では、主に迅速かつ再現性の高い電気泳動結果を得るために、以下のような工夫を行っている。SDS-PAGEでは、定電流ないしは定電圧条件で泳動を行うのが一般的である。メーカー推奨値を比較すると、定電流条件では、定電圧条件と比較し、泳動時間が長時間となるため、定電圧条件を採用している。分離ゲルの試薬混合液は多めに調整し、加える量は目分量とし、加える濃縮ゲルの量により調節することがよく行われている。本実験では、高い再現性と試薬の節約のため、必要な量の分離ゲル試薬混合液を調製し、各ウェル下端の1 cm下までとなる容量の試薬混合液を加えている。生化学実験で用いるマイクロピペットのチップは非常に清純なものであり、1 L前後のストック溶液から直接、必要量をとることが多く行われている。本実験では、試薬の汚染を防ぐため、

緩衝液や純水、アクリルアミド溶液は、50 mLのプラスチックチューブに移したのち用いている。

4. まとめ

SDS-PAGEの分離ゲルの試薬混合液を加えたのちに、水の重層することはほとんど泳動結果に影響を与えない。そのため、水を重層せずに、直接、濃縮ゲルの試薬混合液を加えることにより、電気泳動ゲル作製の大幅な時間短縮が可能であることが示された。

参考文献

- [1] A.Tiselius: A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures, Trans. Faraday Soc., 33, 524-531 (1937).
- [2] U.K.Laemmli: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature, 227, 680-685 (1970).