

TurboMix™ Bis-Tris ゲルキャスティングキットを用いた PAGE および SDS-PAGE 用ハンドキャスティングゲル

はじめに

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)は、タンパク質およびその他の高分子を電気泳動移動度によって分離するために使用される、基本的な技術です。ポリアクリルアミドゲルはアクリルアミド単量体とビスアクリルアミド架橋分子の重合により形成します。アクリルアミドとビスアクリルアミドを合わせると多孔質が形成され、この孔をタンパク質が移動することができます。

ポリアクリルアミドゲルは濃縮用と分離用の2つの部分で構成されます。濃縮用ゲルは、サンプルが分離用ゲルに入る前にサンプルを1つのバンドに濃縮する役割を果たす低濃度アクリルアミドです。分離用ゲルは、タンパク質を分子量により分離する高濃度アクリルアミドです。アクリルアミド濃度とゲル内の孔径は関係しており、アクリルアミドの濃度が高いとゲル内の有効孔径は小さくなります。低分子量のタンパク質を分離するためには、有効孔径は小さい方が望ましいです。

ポリアクリルアミドゲルの化学的性質

PAGEは不連続バッファー系を利用し、ゲルのバッファーイオンは泳動するバッファーイオンとは異なります。これら2種類のイオンの電気泳動移動度の差が電圧勾配を生み出し、この勾配によりタンパク質が移動します。Tris-Glycineゲルの化学的性質がPAGE系ではもっともよく利用され、Tris BaseとGlycineから成る泳動バッファーおよびTris-HClで構成されるゲルを使用します。Tris-Glycineゲルは強アルカリ性環境で操作するため、脱アミノ化やアルキル化など、望まないタンパク質修飾が行われる可能性があります。その結果、Tris-Glycineゲルではタンパク質のバンドが歪み、解像度が低下することがあります。

対照的に、Bis-TrisゲルはゲルバッファーにBis-TrisとHCl、ランニングバッファーにMOPSまたはMESを使用します。Bis-Trisゲルは中性pHで操作するため、タンパク質修飾を最小限に抑え、ゲル泳動中のタンパク質を安定化します。これにより、タンパク質バンドがはっきりし、分析が精確になります。また、Bis-Trisゲルは、時間経過に伴って加水分解が起きるTris-Glycineゲルよりも有効期間が長くなります。Bis-TrisゲルはMOPSまたはMES系ランニングバッファーと組み合わせられる柔軟性があり、これら2つのイオンの移動度には差があるため、タンパク質を分離できる範囲が異なります。MESは低分子量のタンパク質(<50 kDa)に使用され、MOPSは中～高分子量のタンパク質の分離に使用されます。

タンパク質調製時に使用されるサンプルバッファーの種類を検討することも重要です。Tris-Glycineゲルでは、Laemmliバッファーが負に帯電したドデシル硫酸ナトリウム(SDS)イオンでタンパク質を変性し、コーティングするためによく使用されます。この後サンプルを100°Cで沸騰させ、変性を促します。Laemmliバッファーを100°Cに加熱するとpHは強酸性となり、この熱と酸性が組み合わさることで、Asp-Proペプチド結合で優先的にタンパク質開裂が起こることが示されています(Rittenhouse and Marcus, 1984)。この現象により、電気泳動中に明らかなタンパク質分解生成物が生じます。一方、Bis-Trisゲルは、サンプル調製時にアルカリ性pHを維持するドデシル硫酸リチウム(LDS)サンプルバッファーを使用しているため、タンパク質を完全に変性させるために70°Cを超える加熱を必要としません。この調製時の特徴により、Asp-Proペプチド結合の開裂が最小限に抑えられ、タンパク質の完全性が維持されます。

表 1. Tris-Glycine ゲルと Bis-Tris ゲルの化学的性質の比較

	Tris-Glycine	Bis-Tris
操作範囲 pH	9.5 (アルカリ性)	7.0 (中性)
サンプルバッファー pH	5.2	8.5
先頭イオン	Tris (+) Glycine (-)	Tris (+) MOPS (-) または MES (-)
タンパク質分離の範囲	6 ~ 400 kDa	6 ~ 400 kDa
分離中のタンパク質安定性	脱アミノ化とアルキル化が起こる可能性がある	タンパク質の安定性が高い
Asp-Pro ペプチド結合への影響	SDS サンプルバッファーは高温加熱が必要で、開裂が起こる	LDS サンプルバッファーは低温加熱条件のため、Asp-Pro 結合が開裂しない
一般的な泳動電圧	100 ~ 150 V	200 V
一般的な泳動時間	60 ~ 90 分	25 ~ 45 分
有効期間	短期間	3 週間以上

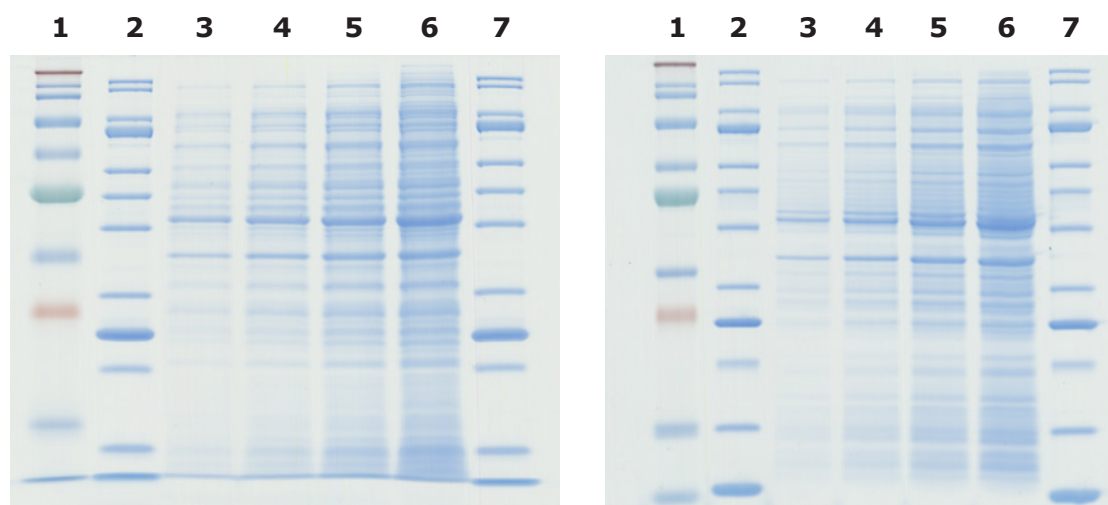


図 1. Tris-Glycine ゲル (左) と Bis-Tris ゲル (右) の比較。Tris-Glycine ゲルと Bis-Tris ゲルは 12% アクリルアミドでハンドキャストし、一晚重合させた。ゲルには、同一の *E. coli* ライセート (レーン 3 ~ 6)、mPAGE® 未染色タンパク質標準物質 (レーン 2 および 7)、および mPAGE® 着色タンパク質標準物質 (レーン 1) をロードした。左のゲルは Tris-Glycine バッファーを使用して 150 V で 60 分間泳動し、右のゲルは MOPS バッファーを使用して 200 V で 35 分間泳動した。いずれのゲルも ReadyBlue® タンパク質ゲル染色液で 1 時間染色し、脱イオン水で 1 時間脱染した。

TurboMix™ Bis-Tris ゲルキャストキット

さまざまな分子量のタンパク質をアクリルアミド勾配で分析するなどの特殊な目的のために、プレキャストポリアクリルアミドゲルを購入することもできますが、多くの研究者は独自のポリアクリルアミドゲルをハンドキャストすることを選択しています。ハンドキャストポリアクリルアミドゲルはプレキャストゲルよりも安価ですが、試薬の調製とキャスト装置の準備は面倒で時間がかかる場合があります。また、ゲルバッファーの調製にばらつきがあると、ゲルの性能や品質が安定しないことがあります。

TurboMix™ Bis-Tris ゲルキャストキットは、プレミックスされたバッファーとアクリルアミド溶液を提供することで、ハンドキャストゲルが持つ調整のばらつきや、時間がかかるという問題を解決します。このキットは、アクリルアミドゲルの分離用ゲルの調製用として、20% アクリルアミド分離ゲル溶液を含みます。分離ゲル溶液は 8 ~ 15% のご希望の濃度に脱イオン水を用いて希釈することができます。またキットには、アクリルアミドゲルの濃縮用ゲルの調製用として、4% アクリルアミド濃縮ゲル溶液を含みます。これらの溶液は、通常分離用ゲルと濃縮用ゲルを作製する際に必要なゲルごとの待ち時間がない、Quick Cast 法を可能とするように考案されています。

プロトコル

Quick Cast プロトコル

- 表 2～4 を使用し、使用するミニゲルキャスティングカセットを充てんするため、どの程度 of 分離用ゲルと濃縮用ゲルが必要かを判断します。サイズの異なるカセットを使用している場合は、量を経験的に判断する必要があります。
- TurboMix™ 分離液、脱イオン水、10% 過硫酸アンモニウム (APS)、TEMED を清潔なガラスピーカーまたは円錐管にピペットで分注し、必要な濃度のアクリルアミドで分離用ゲルを作成します。表 2～4 の分量の倍数を用いて、一度に数種類のゲルをキャスティングすることもできます。**注：**10% APS と TEMED はキャスティング直前、ゲルの重合を始める直前に追加します。
- ゲル混合液に気泡が混入しないように、数回優しく転倒混和します。

表 2. 厚さ 1 mm のミニゲル用

	分離用ゲル				濃縮用ゲル
ゲルの濃度	8%	10%	12%	15%	4%
TurboMix™ 分離用ゲル	2.4 mL	3.0 mL	3.6 mL	4.5 mL	n/a
TurboMix™ 濃縮用ゲル	n/a	n/a	n/a	n/a	2 mL
脱イオン水	3.6 mL	3.0 mL	2.4 mL	1.5 mL	n/a
10% APS	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL	20 µL
TEMED	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL	2 µL

ゲルキャスティング用分離液と濃縮液の調製。記載の分量は 74 x 82 mm、厚さ 1 mm のミニゲル 1 個分のキャスティングに十分な量であり、一度に複数のゲルをキャスティングする場合は n (必要とするゲル数) 倍します。

表 3. 厚さ 0.75 mm のミニゲル用

	分離用ゲル				濃縮用ゲル
ゲルの濃度	8%	10%	12%	15%	4%
TurboMix™ 分離用ゲル	1.8 mL	2.25 mL	2.7 mL	3.38 mL	n/a
TurboMix™ 濃縮用ゲル	n/a	n/a	n/a	n/a	1.5 mL
脱イオン水	2.7 mL	2.25 mL	1.8 mL	1.12 mL	n/a
10% APS	22.5 µL	22.5 µL	22.5 µL	22.5 µL	15 µL
TEMED	2.25 µL	2.25 µL	2.25 µL	2.25 µL	1.5 µL

ゲルキャスティング用分離液と濃縮液の調製。記載の分量は 74 x 82 mm、厚さ 0.75 mm のミニゲル 1 個分のキャスティングに十分な量であり、一度に複数のゲルをキャスティングする場合は n (必要とするゲル数) 倍します。

表 4. 厚さ 1.5 mm のミニゲル用

	分離用ゲル				濃縮用ゲル
ゲルの濃度	8%	10%	12%	15%	4%
TurboMix™ 分離用ゲル	3.6 mL	4.5 mL	5.4 mL	6.75 mL	n/a
TurboMix™ 濃縮用ゲル	n/a	n/a	n/a	n/a	3.0 mL
脱イオン水	5.4 mL	4.5 mL	3.6 mL	2.25 mL	n/a
10% APS	45 µL	45 µL	45 µL	45 µL	30 µL
TEMED	4.5 µL	4.5 µL	4.5 µL	4.5 µL	3 µL

ゲルキャスティング用分離液と濃縮液の調製。記載の分量は 74 x 82 mm、厚さ 1.5 mm のミニゲル 1 個分のキャスティングに十分な量であり、一度に複数のゲルをキャスティングする場合は n (必要とするゲル数) 倍します。

- TurboMix™ 濃縮液を清潔な別のガラスピーカーまたは円錐管にピペットで分注し、必要量の TEMED および 10% APS を追加します。表 2～4 の分量の倍数を用いて、一度に数種類のゲルをキャスティングすることができます。**注：**10% APS と TEMED はキャスティング直前、ゲルの重合を始める直前に追加します。
- ゲル混合液に気泡が入らないように、ガラスピーカーまたは円錐管を数回優しく転倒混和します。
- 血清用ピペットを使用し、各カセットに分離用ゲルを必要量の高さまで充てんします。
- 血清用ピペットをカセットの中央で止め、濃縮用ゲルを優しく加え、ショートプレート上部まで充てんします。ピペットで注入しているところはくぼむことがありますが、そのうち平らになります。

8. 歯の下に気泡が取り込まれないように、素早く慎重にコームを差し込みます。
9. 1 時間ゲルを重合させます。
10. すぐに使用しないゲルは、DI 水を浸したペーパータオルで包み、4°Cの気密容器内で最長 3 週間保存することができます。

サンプルの調製とゲル泳動

1. Bis-Tris ゲルでは、SDS サンプルバッファーよりもアルカリ性が高い LDS サンプルローディングバッファーが必要です。サンプルは DTT またはβ-メルカプトエタノールで還元するか、用途によって非還元とすることができます。サンプルは表 5 に従って調製します。

表 5.

	還元	非還元
サンプル	6.5 ~ X μ L	7.5 ~ X μ L
脱イオン水	X μ L	X μ L
4 倍 LDS バッファー	2.5 μ L	2.5 μ L
1 M DTT	1 μ L	N/A
総量	10 μ L	10 μ L

PAGE サンプル調製の例。LDS サンプルバッファーの最終濃度は 1 倍とする。DTT の最終濃度は 0.1 M とする。

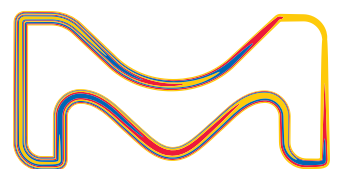
2. サンプルを 70°C で 10 分間加熱します(沸騰させないでください)。
3. サンプルとタンパク質標準物質をウェルに注入します。
4. 空のウェルに等量の 1 倍ローディングバッファーを加えます。
5. 色素またはタンパク質標準物質がゲルの末端に到達するまで、ゲル濃度によって約 25 ~ 45 分、200 V でゲルを泳動させることができます。

ご注文情報

製品名	サイズ	カタログ番号
TurboMix™ Resolving Solution	216 mL	TMRES-216ML
TurboMix™ Stacking Solution	120 mL	TMSTK-120ML
TurboMix™ Bis-Tris Gel Casting Kit	Reagents for casting 10 gels	TMKIT-10
TurboMix™ Bis-Tris Gel Casting Kit	Reagents for casting 60 gels	TMKIT-60
Ammonium persulfate (APS)	25 g	A3678-25G
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	5 mL	T22500-5ML
DL-Dithiothreitol (DTT) solution, 1 M	10 mL	43816-10ML
2-Mercaptoethanol (BME)	25 mL	63689-25ML-F
mPAGE® 4X LDS Sample Buffer	10 mL	MPSB-10ML
mPAGE® 4X LDS Sample Buffer	250 mL	MPSB-250ML
mPAGE® MES SDS Running Buffer Powder	5 packets (each packet makes 1 L buffer)	MPMES
mPAGE® MOPS SDS Running Buffer Powder	5 packets (each packet makes 1 L buffer)	MPMOPS
mPAGE® Transfer Buffer Powder	10 packets (each packet makes 1 L buffer)	MPTRB
mPAGE® Color Protein Standard	500 μ L	MPSTD4
mPAGE® Unstained Protein Standard	500 μ L	MPSTD3
mPAGE® Western Protein Standard	250 μ L	MPSTD2
EZBlue™ Gel Staining Reagent	500 mL	G1041-500ML
ReadyBlue® Protein Gel Stain	1 L	RSB-1L
EZFluor™ 1-step Fluorescent Protein Gel Stain	1 L	SCT145-1L
EZFluor™ UV 1-step Fluorescent Protein Gel Stain	1 L	SCT147-1L
ProteoSilver™ Silver Stain Kit	1 kit for 25 mini-gel	PROTSIL1-1KT

カタログ番号を青で表記している製品の取扱いはメルク株式会社、赤で表記している製品の取扱いはシグマ アルドリッチジャパン合同会社となります。ご確認のうえ、各社へご注文くださいますようお願い申し上げます。

【製品の技術的なお問い合わせ（テクニカルサービス）】
 <メルク製品> TEL : 03-4531-1140 Email : jpts@merckgroup.com
 <シグマ製品> TEL : 03-6756-8245 Email : jpts@merckgroup.com



サイエンス系
お役立ちメディア
M-hub



かんたんカタログ検索
**カタログ
ファインダー**



メルクライフサイエンス - メールニュース
www.merckmillipore.com/wm



メルクライフサイエンス公式
SNS、動画コンテンツをご覧ください。

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格（税別）です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2021年8月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Millipore are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2021 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit No. MK_AN7249EN

メルク株式会社

ライフサイエンス リサーチ事業部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.com/bio

E-mail: jppts@merckgroup.com Tel: 03-4531-1140

LSM054-2108-PDF-H