Application Note

電気泳動　～サンプル調製～

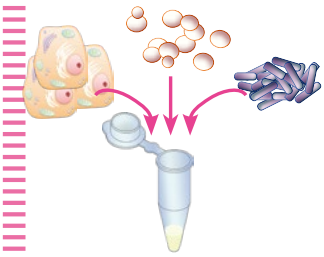
2025 年 6 月 4 日

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。分子量や等電点の概算など解析目的に応じて SDS-PAGE や Native PAGE、２次元電気泳動などの様々な電気泳動方法が活用されています。一方、サンプル調製方法は電気泳動方法に合わせて異なります。今回はアトーの製品を使用した電気泳動サンプルの調製方法に関してご紹介します。

2. 実験の流れ

タンパク質抽出



細胞、組織や微生物などから RIPA Lysis バッファー、尿素系抽出液や SDS サンプルバッファーなどでタンパク質を抽出します。Native PAGE や二次元電気泳動用のタンパク質抽出には、SDS など、極性のあるイオン性界面活性剤は使用しません。

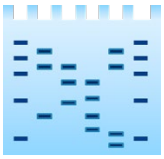
タンパク質抽出・処理液
EzApply, EzLabel FluoroNeo, EzApply 2D kit, EzRIPA Lysis kit, EzBactYeast Crusher

加熱処理

SDS-PAGE 用の泳動サンプルは、SDS や還元剤を含有するサンプルバッファーと混合後、95℃で 3～10 分間加熱して SDS および還元処理を行います。

ブロックインキュベータ
MyMini Block

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。目的タンパク質の分子量が不明な場合は濃度勾配ゲルを使用します。泳動後のゲルは CBB 染色等でバンドを確認したり、ウェスタンブロッティング等の解析に使用します。

ゲル・電極バッファー
ePAGEL HR, EzRun

ゲル染色液
EzStain AQua/Silver/Reverse

電気泳動槽・パワーサプライ
Pagerun-R, MyPower

シェーカー
SeesawShaker atto

ゲルの染色

Native PAGE 用サンプルの調製

Native PAGE はタンパク質を変性させずに電気泳動で分離する方法です。タンパク質のコンプレックス、立体構造、分子量、電荷のすべてが影響するため、シャープなバンドパターンを得ることは困難です。そこで、サンプルを尿素処理などによりリニアライズしたり、Blue-Native PAGE のようにサンプルバッファーや泳動バッファーに若干電荷を付加して泳動する方法もあります。分離する目的タンパク質の電荷（等電点）に合わせて、Tris-Glycine (pH8.3~9.5) や Tris-borate (pH7.0~8.5)、Tris-acetate (pH7.2~8.5) などの泳動バッファーを陰極側と陽極側で組み合わせて分離します。

実験方法：

① 45 μ L のサンプルに 5 μ L の **EzApply Native** (10x) を加えて混合します。

② サンプルは加熱処理はしません。目的タンパク質の等電点に合わせて、泳動バッファーを陰極と陽極で組み合わせて使用します。また電気泳動は低温でゆっくり泳動します。

3. SDS-PAGE 用サンプル調製

3-1. SDS-PAGE 用サンプルの調製（EzApply）

SDS-PAGE は分子量の概算や精製度の解析に使用される泳動方法です。泳動用サンプルは SDS と還元剤が添加された試薬で調製するため、タンパク質コンプレックスは解離し、リニアライズされた後に SDS が付加されるため（～ 1.4g of SDS/g of Protein）、タンパク質の電荷や構造が無視できるといわれています。

実験材料：　組織・細胞・細菌等
EzApply　（**AE-1430**）
マイクロ遠心チューブ、チップ等
遠心機、ピペットマン等

実験方法：

① 50 μ L のサンプルに 50 μ L の **EzApply**（2 ×濃度、DTT 添加済み）を加えて混合します。

② **MyMiniBlock** で 95℃ 5 分間加熱します（煮沸でも OK）。

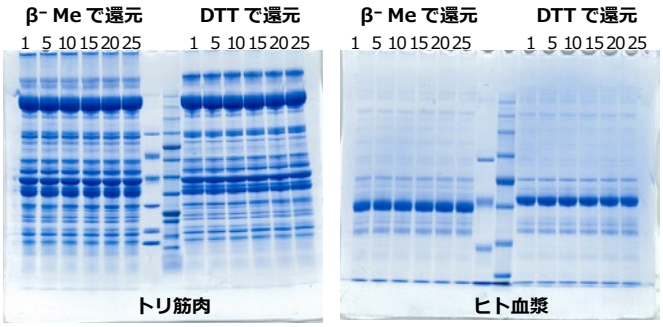
③ 15,000rpm で 5 分間遠心し（しなくても OK）上清を回収します。

※作製したサンプルは -20℃で保存可能です。

※組織や細胞などを直接溶解する際は、**EzApply** を蒸留水で 1 ×濃度に希釈します。組織及び細胞塊の 2.5 ～ 3 倍容量の 1 × **EzApply** を添加し、解剖ハサミによる細断やホモジェナイズ等を行って完全に溶解します。溶解後の抽出液は上述の方法と同様に加熱し、遠心後の上清を別のチューブに回収します。

3-3. 参考データ（EzApply）

実験例 1 ：還元剤の違い



上図はトリ筋肉およびヒト血漿タンパク質を抽出し、**EzApply** で電気泳動サンプルを調製して電気泳動をした結果です。トリ筋肉は **ePAGEL** (E-T520L) で、ヒト血漿タンパク質は **ePAGEL** (E-T7.5L) で分離し、泳動後のゲルは **EzStain AQua** で染色しました。また抽出する際に、β-メルカプトエタノール（β- Me) を使用した場合（ゲルの左サイド）と DTT を使用した場合（ゲルの右サイド）を比較しました。還元剤の違いにより、バンドの形状やパターンが若干異なることが判ります。特にヒト血漿タンパク質のバンドでは顕著に示されていますが、DTT を還元剤として使用した方が、よりバンドがシャープに分離されます。
各レーンの上部に表示された数字は、電気泳動サンプル調製後に凍結融解を繰り返した回数を示しています。いずれの還元剤を使用した場合も、20 回程度の凍結融解により顕著な劣化は生じないことが示されました（タンパク質の性状や、凍結-融解温度や方法等により影響されます）。

主な電気泳動サンプル調製試薬の組成

電気泳動サンプル調製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パジェ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

等電点電気泳動タンパク質の抽出液（O'Farrell 法）
9.5 M Urea, 2% NP-40, 1.6% Ampholine 5-7, 0.4% Amphjoline 3-10, 5% β -Mercaptoethanol / 10 mL

3-3. 蛍光標識サンプルの調製（EzLabel FluoroNeo）

EzLabel FluoroNeo は SDS サンプルバッファーの代わりにタンパク質溶液と混ぜて加熱するだけで、タンパク質の蛍光標識と電気泳動用サンプル調製ができます。電気泳動後のゲルは、すぐに、Blue LED あるいは UV で励起することにより、バンドが検出できます [Ex: 330（UV), 470 nm, Em: 530 nm]。

実験材料： 組織・細胞・細菌等
EzLabel FluoroNeo （**WSE-7010**）
マイクロ遠心チューブ、チップ、ピペットマン等
VariRays Ⅰ / Ⅱ（WSE-5510/5520）、遠心機

実験方法：

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℃ 3 分間加熱します（煮沸でも OK）。

③ ②の混合液に Reducing agent (DTT) を 2μL 添加して混合します。

④ **MyMiniBlock** で 95℃ 3 分間加熱します（煮沸でも OK）。

※作製したサンプルは -20℃で遮光保存可能です。

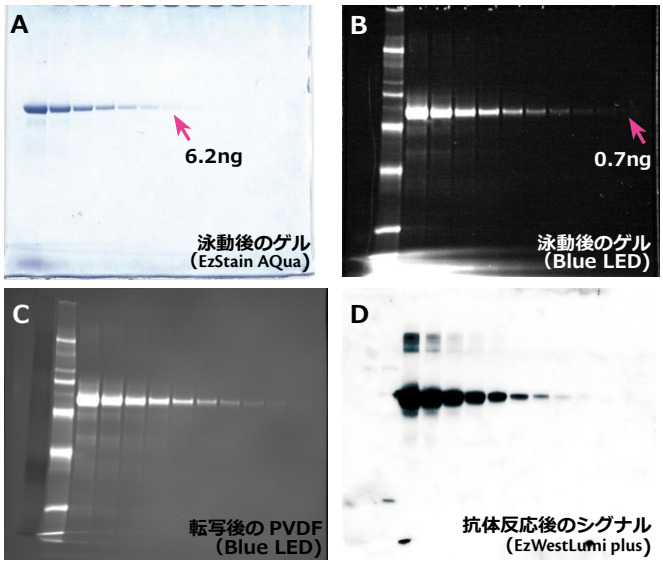
※サンプルの溶媒に Tris などのアミノ基が含まれると、非特異的なシグナルが出る原因になります（泳動後のゲルを蒸留水で洗浄すると非特異的シグナルは消失します）。

※サンプル中に還元剤が含まれると蛍光標識反応を著しく妨げる原因となります。標識後に還元処理をしてください。

※蛍光標識タンパク質はウェスタンブロット解析に使用することができます。蛍光シグナルを利用して転写効率等を確認することが可能です。

3-4. 参考データ（EzLabel FluoroNeo）

実験例 2 ：**EzLabel FluoroNeo** 標識サンプル



上記写真の A はヒトトランスフェリンタンパク質を **EzApply** で処理して 400 ng/ レーンからの 1/2 希釈系列で電気泳動し、**EzStain AQua** で染色した結果を示しています。写真 B~D はヒトトランスフェリンタンパク質を **EzLabel FluoroNeo** で処理した電気泳動サンプルを使用しています。写真 B は蛍光標識後のタンパク質を 400 ng/ レーンからの 1/2 希釈系列で電気泳動し、泳動後のゲルを Blue LED で励起し、540LP フィルターを使用して撮影した結果を示しています。撮影後のゲルは **EzFastBlot** で軽く洗浄し、**EzFastBlot** を使用して P plus（PVDF）膜に転写しました。写真 C は転写後の膜をゲルと同様に Blue LED で励起し、540LP フィルターを使用して撮影した結果を示しています。転写後の膜は **EzBlock Chemi** でブロッキング後、抗ヒトトランスフェリン抗体および HRP 標識 2 次抗体と抗体反応し、**EzWestLumi plus** で検出しました（D）。このように **EzLabel FluoroNeo** で蛍光標識したタンパク質は、CBB 染色したゲルよりも検出感度が高く、
電気泳動後のタンパク質を直ちに検出でき、また転写後の PVDF 上のタンパク質も Blue LED で容易に可視化して転写効率や転写ムラの有無等を確認することが可能です。さらにウェスタンブロッティングの抗体反応を妨げることなく、特異的なシグナルを検出することができます。

※ アトー HP「テクニカルインフォメーション」ページより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、ぜひご一読ください。
https://www.atto.co.jp/technical_info

4. 等電点電気泳動用サンプル調製

4-1. 等電点電気泳動用サンプルの調製（EzApply 2D kit）

2 次元電気泳動は 1 次元目に等電点電気泳動を、2 次元目に SDS-PAGE を行って分離します。等電点電気泳動はタンパク質固有の電荷（等電点：pI）を利用して分離する方法です。泳動サンプルは高濃度の尿素で抽出し、SH 基還元処理を行うため、タンパク質の立体構造は無視できるといわれています。

実験材料： 組織・細胞・細菌等
EzApply 2D kit （**AE-1435**）
マイクロ遠心チューブ、チップ等
超音波破砕装置、遠心機
VariRays Ⅰ / Ⅱ（WSE-5510/5520）、ピペットマン等

実験方法：

① 組織は生理食塩水等で洗浄後、解剖用ハサミで細断します。細断後の組織および細胞、細菌をキット添付の 1 mL の **Wash buffer** で洗浄します。

② 遠心（4,000 rpm で 10 ～ 60 秒間）し上清を廃棄します。

③ 遠心沈査の 2.5 ～ 3 倍容量の **Solution 2**（キット添付）を添加し、超音波破砕します。

※ DNA が抽出されるため、溶媒の粘性が高まりますが、超音波破砕により軽減します。

※可溶性成分と不溶性成分を分けて抽出する場合は、**Solution 1**（キット添付）を使用し、2 段階抽出します。詳しくはキット添付の取扱説明書でご確認ください。

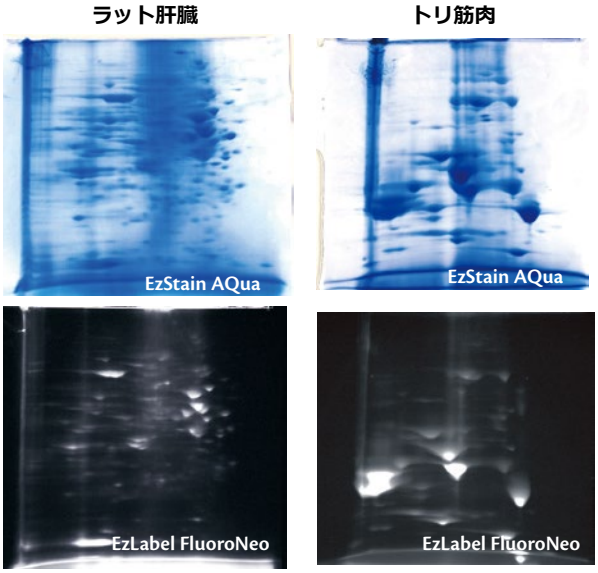
④ 13,000~17,000xg で 10 ～ 20 分間遠心します。

⑤ 上清を回収し、1/5 容量の **Solution 2-2**（キット添付）を添加し、室温で 10 分間反応します（還元アルキル化処理）。

※還元アルキル化処理は必須ではありません。

4-2. 参考データ（EzApply 2D kit）

実験例 3 ：二次元電気泳動



ラット肝臓タンパク質およびトリ筋肉から **EzApply 2D kit** を使用してタンパク質を抽出し、**agarGEL、A-M310** を使用して一次元目の等電点電気泳動を行いました。上記写真のうち上段は一次元目のゲルを通常の方法で SDS 平衡化処理し、下段は SDS 平衡化処理する際に **EzLabel FluoroNeo** の **1x Sample buffer**（**Labeling reagent** 添加済み、DTT 非添加) で 30 分間、さらに DTT 添加 **1x Sample buffer** で 10 分間処理しました。2 次元目の電気泳動は **ePAGEL**（E-D520L) を使用して分離しました。上段は泳動後のゲルを **EzStain AQua** で染色した結果を示しています。また下段は泳動後のゲルを Blue LED で励起し、540LP フィルターを使用して撮影した結果を示しています。一次元目の分離にアガロースを担体とするゲルを使用しているため、大量のタンパク質をアプライして分離することができ、また高分子タンパク質も解析可能なことが判ります。

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/ お問合わせ WEB会員登録の上お問合わせフォームより