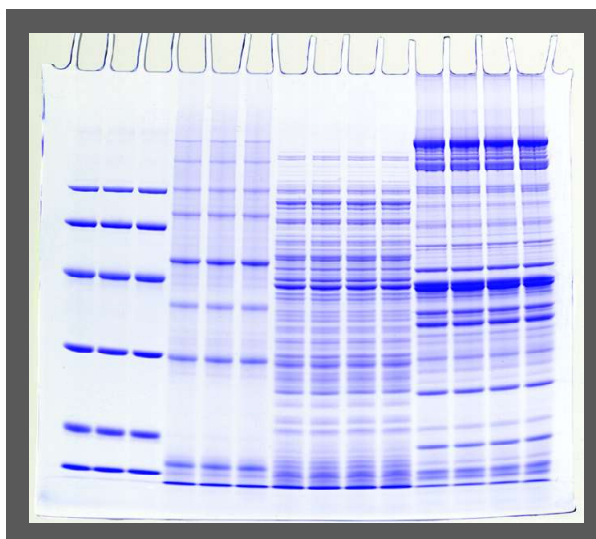


PAGE

(Polyacrylamide gel Electrophoresis)

初めての電気泳動

ータンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動編ー



1. 電気泳動

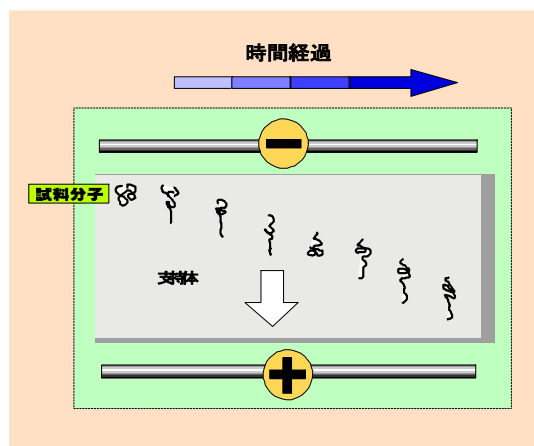
原理

電気泳動とは、溶液中の荷電物質が電場のもとで移動する現象を言います。

ここで言う荷電物質は緩衝液成分を除くペプチド・タンパク質・核酸（DNA・RNA）など、水溶液中で+又は-の荷電を持つ物のことで、いわゆる電気泳動の試料です。ただし水溶液中では試料が拡散してしまうため支持体として膜やゲルを用い、これらの中を荷電物質（試料）が移動していく形態をとるのがほとんどです。支持体（膜・ゲル）中の試料は、直流電場下で、その性質（形や荷電状態や分子量等）に応じて自分の電荷と反対の電極へ向かって移動します。その際の移動速度が物質によって異なることで各々が分離されるのです。

支持体であるアガロースゲル又はポリアクリルアミドゲルは網目状立体構造をもち、試料に対し分子ふるいの役割をはたします。小さな物質は速く、大きな物質は遅く移動し、分子量に応じた分離が可能です。この時移動距離と分子量はほぼ反比例するので、電気泳動を用いて分子量の決定も可能です。また分子ふるいをかけずに荷電状態や形状に応じた分離方法もあります。この様な要因をいろいろ組み合わせて試料中の各成分を分離することが出来ます。

電気泳動はこの様な分離原理を利用して分子量決定をはじめ等電点や純度決定、各成分の定量・精製等に利用され、タンパク質や核酸の主たる分離・分析法となっています。



種類

試料：ペプチド、タンパク質、糖タンパク、リポタンパク、ヌクレオチド、核酸（DNA・RNA）

支持体：ろ紙、セルロースアセテート膜、ポリアクリルアミドゲル、アガロースゲル、寒天

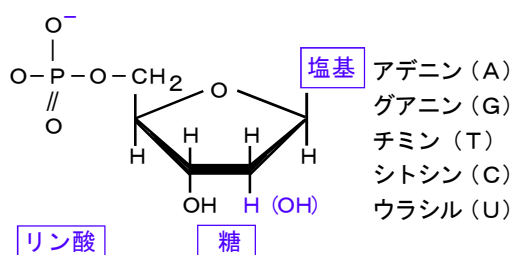
形態・方法：ディスクゲル電気泳動、スラブゲル電気泳動、サブマリン電気泳動、

等電点電気泳動、二次元電気泳動、キャピラリー電気泳動

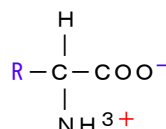
★参考：核酸、タンパク質の構造と大きさ

核酸はリン酸残基で常にマイナス（-）の荷電を持ちますが、タンパク質はアミノ酸の種類や環境（周りのpH）によって（+）にも（-）にもなります。

「遺伝子」核酸（DNA・RNA）－ヌクレオチド



「酵素」タンパク質－ペプチド－アミノ酸
20種類の標準アミノ酸



核酸、タンパク質の大きさは約2～10 nm、 $10^3 \sim 10^9$ の分子量をもつ

2. 電気泳動の操作

以下に一般的な電気泳動の操作を示します。詳細は試料や泳動方法、検出方法によって異なりますが、早い場合で約1.5時間、泳動や検出に時間を要する場合には1日以上かかることもあります。

一般的な電気泳動全般の操作の流れ

①試薬・試料の準備

↓ 試料、泳動用緩衝液、ゲル用ストック液等を準備する。

②泳動用ゲルの作製

↓ 目的とする試料の分子量によりゲル濃度を決定しゲルを作製する。

③試料前処理

↓ 試料を完全に溶解する。比重をつける。

④試料塗布

↓ ゲルを泳動槽に設置し試料を塗布する。

⑤泳動（通電）

↓ 泳動槽を電源装置に接続し適当な時間出力する。

⑥染色

↓ 染色液中にゲルを浸し試料成分の染色を行なう。

⑦脱色

↓ 試料成分と結合しない余分な染色剤を洗い落とす。

⑧検出（可視化）

↓ 色素染色、発色の場合には成分が目で見える。

又は 蛍光色素染色の場合は紫外線を照射し検出する。

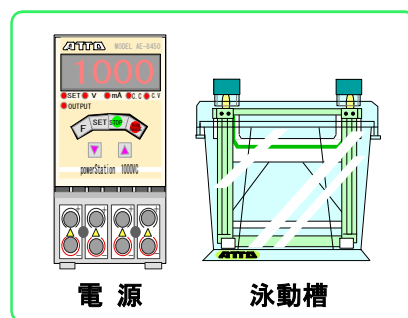
⑨保存

↓ 乾燥器でゲルを乾燥させフィルム状にし、保存する 又は写真にとる。

↓ カメラやスキャナーでコンピューターに取込む。

⑩解析

データから内容を解析する。



他、泳動後プロットイング（膜への転写）して特異的検出を行なう方法、ゲルから成分（分離された試料）を回収する方法等もある。

3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

最も一般的な電気泳動はタンパク質や核酸のポリアクリルアミドゲル電気泳動およびアガロースゲル電気泳動です。ポリアクリルアミドゲルとアガロースゲルの違い（使い分け）は網目の孔の大きさ（ポアサイズ）で、主にポリアクリルアミドゲルは小さく低分子量用、アガロースゲルは大きく高分子量用と考えて良いでしょう。例えば核酸（DNA）で1～700bpの大きさにはポリアクリルアミドゲルを使用し、約500bp以上の大きさにはアガロースゲルを使用するのが定法です。又タンパク質は、数百Daぐらいのペプチドから数十kDaのタンパク質（多くのタンパク質はこの範囲に含まれる）であればポリアクリルアミドゲル電気泳動で対応可能です。

以下、ポリアクリルアミドゲルについてご説明しましょう。

ポリアクリルアミドゲル

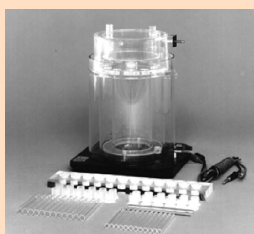
ポリアクリルアミドゲルはアクリルアミドとN, N'-メチレンビスアクリルアミド (Bis) の重合体です。アクリルアミドだけでは直鎖状につながっていただけですが、Bisを加えるとこれが架橋の役割を果たし網目（三次元）構造を持った重合体（ゲル）となるのです。ちなみにゲル作製（重合）時に一緒に加える過硫酸アンモニウムは重合開始剤、TEMED（N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン）は重合促進剤です。電気泳動支持体としてのポリアクリルアミドゲルは、無色透明、耐薬性（強アルカリ・酸や変性剤の共存可能）、試料の吸着が無い、ポアサイズ（分子ふるい効果）が調整できる、強度がある、高純度・安価な試薬、乾燥・保存出来る等の特長を備えています。ただし重合前のアクリルアミドは神経毒なので取り扱いには注意して下さい。重合体には毒性が無いとされているので、余った溶液等は固めて破棄することをお勧めします。

電気泳動の場合、アクリルアミドとBisの総和をゲル濃度（アクリルアミド濃度）と言い、通常3～20%の範囲で利用されます。おおよそゲル濃度が高くなれば網目が小さくなるので分子量の小さい試料が対象となります。つまり分離したい試料の分子量に応じて適切なゲル濃度を選択することが大事です。試料の分子量がわからなかったり、広範囲にわたって分離したい時には5～20%の様なグラディエント（濃度勾配）ゲルの利用法もあります。又、一度作製したゲルは一日以上は置かないで下さい。（濃縮ゲルを作製した場合は放置不可）長時間のアルカリ性条件下でポリアクリルアミドは分解が起こり、生じたアクリル酸のカルボキシル基が泳動に影響を及ぼします。他、酸素（空気）の存在はゲル化を阻害すること、温度が低いとゲル化しにくいこと等は基本的な性質として覚えておいて下さい。

「8. 電気泳動のコツ」参照

種類

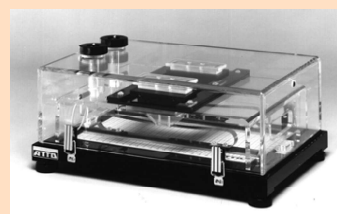
タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動にも多数種類があります。形から大別するとディスク型、スラブ（垂直）型、水平型等があり電気泳動に応じて使い分けます。方法では分子量サイズで分けるSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）、等電点で分ける等電点電気泳動（IEF）、二つの要因（例えば上記の分子量サイズと等電点）で二次元に展開する二次元電気泳動等があります。



ディスク電気泳動装置
「等電点ディスク電気泳動装置」



スラブ型電気泳動装置
「ラビダス・ミニスラブ電気泳動槽」



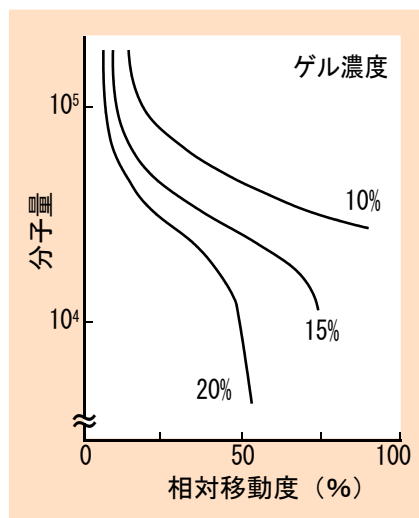
水平型電気泳動装置
「レゾルマックスIEF」

* 参考書：ポリアクリルアミドゲル電気泳動 高木俊夫編著 廣川書店
原理、実験操作がタンパク質、Laemmli法に限らず詳細に説明されています。

4. SDS電気泳動 (Laemmli法)

SDS電気泳動 (SDS-PAGE)

SDSはドデシル硫酸ナトリウム ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$) の略で陰イオン性界面活性剤の一種です。タンパク質の可溶化剤として利用され、タンパク質の電気泳動ではSDS-PAGE (SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法) という最も一般的な手法に用いられます。SDSはタンパク質にイオンの結合する他ミセルを形成する事もあり、その結合量はポリペプチド鎖 (タンパク質) 1に対して1.2~1.5とされています。タンパク質は構成アミノ酸により (+) どちらにも荷電 (1頁参考) しますが、SDSが結合 (SDS処理) することでその電荷を打ち消し一過性に (-) 荷電を持たせて、全ての分子を陽極側へ移動させることが可能となります。その際、ゲルの網目構造によりほぼ分子量の大きさに各々のタンパク質を分離することができます。泳動 (検出) 後は、縦軸に分子量を指数関数に、横軸にタンパク質の移動度をとったグラフで分子量既知のタンパク質の移動度を測って検量線を作製し (右図参照)、未知のタンパク質の分子量推定が可能です。このSDS-PAGEにも多くの種類がありますが、現在最も多く利用されているのがLaemmliの方法です。Laemmli法は、実際に分離を行なうゲルの上に濃縮ゲルを作製し、塩化物イオン (Cl^-) とグリシネートイオンを利用して試料を濃縮する為バンドがシャープになるのが特徴です。ゲル中はトリス-塩酸 (Tris-HCl)、泳動用緩衝液はトリス-グリシン (Tris-Gly.) を用いSDS存在下で泳動を行ないます。 (下図参照)



試料

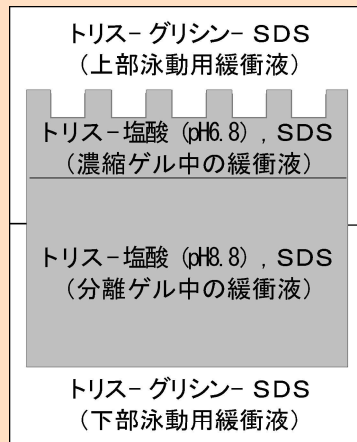
電気泳動の大前提として試料は溶解していなければなりません。タンパク質ではSDSが可溶化剤として働くのでまずSDS処理を行ない、沈殿物があるようなら遠心を取り除きます。SDS処理はSDS溶液 (試料処理液) と混合した後加熱2~3分が一般的ですが、熱を加えず室温で一晩放置する方法もあります。試料によって検討してみてください。試料の保存方法はSDS処理の前後に関わらず一般的に冷凍下で保存しますが、再融解の繰返しはお勧め出来ません。

5. 緩衝液と通電条件

緩衝液

試料や泳動方法によって使用される緩衝液は様々です。 (等電点電気泳動では緩衝液は使いません。) タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動ではリン酸緩衝液系やトリス緩衝液系が多く用いられます。SDS-PAGEのWeber-Osborn法はリン酸緩衝液、Laemmli法ではトリス緩衝液系で、いずれもアルカリ性条件下です。Laemmli法の特徴として、ゲル中はトリス-塩酸 (Tris-HCl)、泳動用緩衝液はトリス-グリシン (Tris-Gly.) の緩衝液が用いられ、塩化物イオン (Cl^-) とグリシネートイオンの移動度の差を利用して試料を濃縮し、結果としてシャープなバンドを得ることができます。従って、泳動用緩衝液にpHを合わせようと塩酸

Laemmli法の溶液系



(C 17) を加えたり、一度使用した泳動用緩衝液を再度使用したりするとイオン系がおかしくなり泳動パターン（結果）に影響を及ぼす事があるので、この様な事はしないで下さい。また、調製や希釈の際に濃度を間違えたりすると泳動パターンが乱れたり、泳動時間が非常に長くなることがあります。念の為通電時の電流値、電圧値、泳動時間等はメモしておくといでしょう。

通電条件

試料（物質）が電場を移動していくのが電気泳動の原理ですが、通常この電場は直流電場のことを言います。電気泳動専用の電源がその制御・供給を行なう装置になります。泳動方法に応じて必要な電気容量は異なりますが、タンパク質のPAGE（スラブ型）の泳動では電流100mA、電圧500Vもあれば充分でしょう。設定（通電条件）に関して「定電流、定電圧の設定はどのように決めるの？」と質問される事が多いのですが、電気泳動の通電条件はほとんどが慣習的と言っても過言ではありません。定電圧設定が良く使われる例としてはサブマリン型のアガロース電気泳動があります。これはサブマリン型は通電（断）面積（ゲル厚や緩衝液量）の一定化が難しい為、定電流設定では再現性が無くなるからだと思われます。また、シークエンスや等電点では定電力設定を用いると良いでしょう。泳動開始直後は電流が流れ易い状態で発熱等も大きくなるので、定電力にしておけば電流が高いうちは電圧が押さえられ、電流が下がってくると電圧が高くなり自動調節のようになるのです。SDS-PAGEは定電流設定が用いられています。一般的に泳動は（拡散しない程度に）ゆっくりの方がパターンはきれいだと言われています。しかし、効率（時間）の点からパターンがひどくならない程度に出力を上げ早く終らせるようにしています。いずれにせよ常にジュール熱（通電時に発生する熱）による影響は考慮しなければなりません。熱により試料が拡散したり、分解・不活性化等の影響が出る場合は、通電条件を変更したりゲルの恒温（冷却）化等の対処が必要です。電源・泳動槽一体型の装置「コンパクトPAGE（・ツイン）」や「パジェラン」は以上の様な条件を考慮したうえで一定電流出力設定になっています。

さて、通電条件に関しては「電流は通電面積に比例し電圧は電極間距離（ゲル長）に比例する」という原則を覚えておくと便利でしょう。例えば、2連の泳動槽でゲル1枚あたり20mAで泳動していて次に同条件で2枚泳動するのであれば40mAに設定します。1mmのゲル厚で20mAで泳動していて次に同条件で2mm厚のゲルを泳動したいのであれば40mAに設定する、という事です。また1台の電源に泳動槽を2台（電源端子から各々1台）つなぐ時は、電源内部は並列であることが解っていれば、定電流設定なら電流値を2倍に、定電圧設定なら電圧値はそのままが良いわけです。電圧に関しては、泳動距離が長い場合（大きな泳動装置）や温度が低い場合等は、抵抗が大きいので高電圧を必要とする場合が多くなります。他、定電流をC・C（Constant Current）、定電圧をC・V（Constant Voltage）と現す事も多いので覚えておいて下さい。

6. 検出

検出方法

一般的に試料（タンパク質）は目に見えないものですので電気泳動後は速やかにその検出を行ないます。タンパク質ではまず色素染色が定法で、その中でもCBB（クマシーブリリアントブルー）色素による染色が代表的です。色素染色はその溶液中に泳動後のゲルを浸けておくだけで良いので、簡単で安価な方法です。CBBは感度も数百ngと高く直線性もあります。CBBにはG-250とR-250があり若干色味が異なりますがどちらでもかまいません。他、色素染色にはアミドブラック10Bという、感度は劣りますが糖タンパク質の検出には有効なものもあります。いずれも酢酸・メタノール中で染色・脱色を行ないタンパク質の固定も兼ねています。最近では蛍光色素も用いられますが、紫外線照射装置等の検出装置が必要となります。ネガティブ法とはバックグラウンド（ゲル）が白濁しタンパク質（バンド）が透明

検出法	反 応	具 体 例	操作性	感度
色素染色	有色色素のタンパク質結合	CBB (クマシーブリリアントブルー) アミドブラック 10B	◎ ◎	○ △
	蛍光色素のタンパク質結合	サイプロオレンジ TM	○	◎
初タイプ法*	SDSと陽イオンの白濁*	Zn、K、Ca等 *バックグラウンドが白濁	○	○
銀染色	銀の沈着	銀染色 (シルバーステイン)	△	◎
標識法	タンパク質標識物の検出	RI、蛍光色素	×～○	◎～◎◎

なまま残るので、この様に呼ばれます。弊社では「リバーサ染色試薬」がこれに相当します。CBBより感度が高く、検出までの時間が早いという特徴もあります。更に高感度な検出法として銀染色 (シルバーステイン) が良く用いられます。CBBの約100倍程度の感度で数ngの検出が可能です。染色法に比較すると操作過程が多かったり再現性が若干低い等問題もありますが、市販の物は工夫がなされ大分使い易くなっています。弊社では「シルバーステインキット」として販売しています。標識法は最も高感度の検出法ですが、RI (放射線同位元素) や蛍光物質を試料に取込ませる又は結合させる前処理や専用の検出装置が必要となります。

解析・保存

得られた泳動パターンから目的に応じて解析します。例えばあるバンド (タンパク質) の分子量を測定する場合は、分子量既知のタンパク質 (分子量マーカー) の移動度を測って検量線を作製し (4. SDS電気泳動図参照)、これを利用して分子量を推定します。また試料の比較を行なう場合には、バンドの有無や濃さを見ます。データの保存方法としては、ゲル (泳動パターン) を写真撮影したり、ゲルその物を乾燥して保存する方法等があります。最近ではCCDカメラで撮影およびコンピュータに撮り込んで専用ソフトウェアで解析する方法が広まっています。この様な機器 (弊社「プリントグラフ」「CSアナライザー」) を利用すると解析 (分子量測定、パターン比較、定量等)、データ (泳動パターン、解析結果) の保存、プリントアウトが簡単に行なえ、ゲルを取っておく必要もないので便利です。



「プリントグラフ 2M」

7. 電気泳動実践編

以下、代表的なタンパク質の泳動であるLaemmli法 (SDS-PAGE) を例に、実際に電気泳動を行なう時の注意点等を紹介しましょう。

* 詳細は取扱説明書をご覧ください

必要な機器・試薬

トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris)、グリシン、SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、塩酸、アクリルアミド、N,N'-メチレンビスアクリルアミド (Bis)、過硫酸アンモニウム、TEMED、グリセリン、2-メルカプトエタノール、酢酸、メタノール、CBB (クマシーブリリアントブルー) G-250 又は R-250、分子量マーカー、BPB (ブロムフェノールブルー)

* 既製ゲル (「e-PAGE L」パジェルシリーズ) を使用する場合はアクリルアミド、ビスアクリルアミド、過硫酸アンモニウム、TEMEDは不要。

* 電気泳動用又は特級グレードが望ましい。酢酸、メタノールは1級でも良い。

* 分子量マーカーは試料の分子量を目安に決める。不明な場合は約10000～90000又は200000の範囲のものならほぼカバーできる。

電気泳動装置（槽）ATTO「ラピダス・ミニスラブ」、電気泳動用電源ATTO「パワーステーションⅢ」、又は電源泳動槽一体型装置ATTO「コンパクトPAGE（・ツイン-R）」、マイクロピペット（1～20 μ L、20～100 μ L）、マイクロピペットチップ、ホールピペット、ビーカー、メスシリンダー、遠心チューブ（1.5ml）又は試験管、電熱器（湯煎用）、天秤、スターラー（攪拌器）、保存用びん、トレイ（ゲル染色用）、ろ紙、ロート

試薬の調製

*既製ゲルATTO e-PAGELを使用する場合は①～④液は不要。

*ATTO EzStainAQuar（染色液）を使用する場合は⑦⑧液は不要。

*ATTO EzApply（前処理液）を使用する場合は⑥⑨液は不要。

- | | |
|--|---|
| ①A溶液（30% アクリルアミド保存液）
アクリルアミド
N,N'-メチレンビスアクリルアミド
純水に溶解し100mLとします。 | 冷暗所保存
29.2g
0.8g |
| ②B溶液（1.5M Tris-HCl 緩衝液、0.4%SDS）
トリスヒドロキシメチルアミノメタン（Tris）
ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）
以上を純水に加え、塩酸（HCl）で <u>pH 8.8に調製</u> し、100mLとします。 | 冷暗所保存
18.2g
0.4g |
| ③C溶液（0.5M Tris-HCl 緩衝液、0.4%SDS）
トリスヒドロキシメチルアミノメタン（Tris）
ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）
以上を純水に加え、塩酸（HCl）で <u>pH 6.8に調製</u> し、100mLとします。 | 冷暗所保存
6.1g
0.4g |
| ④D溶液（10% 過硫酸アンモニウム）
過硫酸アンモニウム
純水 1mL に溶解します。 | <u>使用時調製</u>
100mg |
| ⑤泳動槽（上部、下部槽）用緩衝液
トリスヒドロキシメチルアミノメタン（Tris）
ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）
グリシン
純水で500mLとします（ミニスラブ泳動1回分、コンパクトPAGE泳動5回分に相当）。 <u>HClでのpH調整は行いません。</u> | 冷暗所保存
1.5g (25mM)
0.5g (0.1%)
7.2g (192mM) |
| ⑥マーカー色素（BPB）溶液
ブロムフェノールブルー（BPB）
グリセリン
純水 | 冷暗所保存
1mg
0.1mL
0.9mL |
| ⑦クマジーブリリアントブルー（CBB）染色液
クマジーブリリアントブルー（CBB）
メタノール
酢酸
純水
ろ紙で <u>ろ過</u> してから使用します。 | 密閉保存
1g
300mL
100mL
600mL |
| ⑧クマジーブリリアントブルー（CBB）脱色液
メタノール
酢酸
純水 | 密閉保存
300mL
100mL
600mL |

⑨試料処理液

ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)
2-メルカプトエタノール (又は DTT)
C 溶液 (0.5M Tris-HCl 緩衝液 pH6.8)
グリセリン
純水で 10mL とします。

冷暗所保存

0.1g (1%)
0.1mL (1%)
1mL (50mM)
2mL (20%)

- * 各溶液、特に①②③液調製時には激しい攪拌を行わない事。アクリルアミドは酸素（空気）が重合阻害になるため、泡立ったりするとゲル調製時に固まりにくくなる。
- * 酢酸、メタノールはタンパク質（試料）の固定作用がある。
- * ⑨試料処理液は試料が固体（結晶等）だったり溶液でもタンパク質濃度が高い場合に有効。アブライ時試料溶液のタンパク質終濃度は C B B 染色の場合 1～2mg/mL が目安。試料のタンパク質濃度が低い場合には⑨混ぜずに各溶液を上記の終濃度になるように各々加えていく。

操 作

1. 電気泳動（タンパク質の分離）

ゲルを作製（既製ゲル使用の場合は不要）

ガラスプレートを組み立てる

分離ゲル溶液を調製・注入

純水を重層し、ゲル化（30～60分）

濃縮ゲル溶液を調製

純水を捨て濃縮ゲル溶液少量注入し洗浄

濃縮ゲル溶液を注入

サンプルコウムを挿入、ゲル化（20～30分）



試料（ex. 血清、細胞抽出物）を用意



SDS 処理（タンパク質の可溶化・マイナス荷電、比重）

SDS 溶液と混合（全量約 100～500 μ L）

煮沸又は室温



泳動槽・緩衝液等準備、ゲルを泳動槽にセット

下部緩衝液を入れ、サンプルコウムを抜き洗浄したゲルをセットし上部緩衝液を入れる



泳動用ゲルに試料を塗布する（約 3～15 μ L *）

なるべく試料溝底部に近いところまで

チップやシリンジの先端を入れ静かに塗布する



通電開始

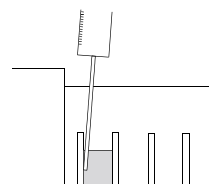
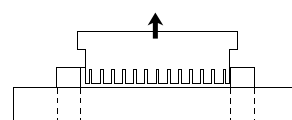
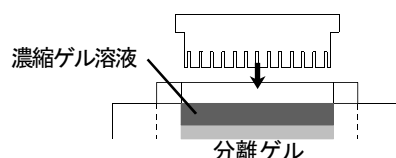
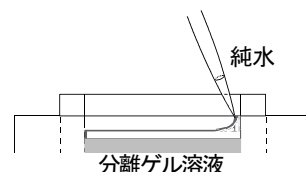
一定電流（C. C）20mA／ゲル1枚*

（約 70～90 分間*）

* 上記は「ミニスラブ」の場合

「コンパクトPAGE（・ツイン）」の場合は、試料は最大 8 μ L

一定電流出力（30分間または60分間）



2. 検出（染脱色）・保存

泳動終了



ゲルをガラスプレートから出す

ゲルが着いているところを濡れたヘラで切り込みを入れ

ガラスプレートを逆さまにしてゲルの端を剥がす



ゲル（タンパク質）を染色 ゆっくり振とう

通常 40 ～ 60 分が目安



脱色（余分な色素を洗い流す） ゆっくり振とう、数回液交換

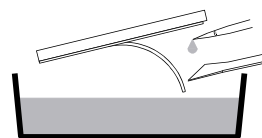
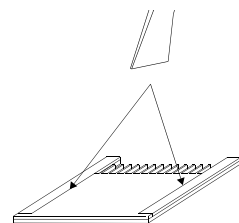
ゲル（バックグラウンド）が透明に近くなるまで



泳動パターンの撮影（データ保存）



（必要であればゲルを乾燥・保存）



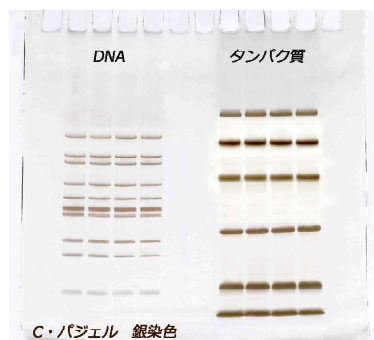
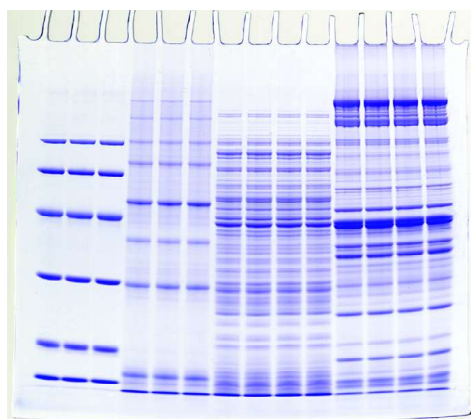
実際に泳動・検出を行ったゲル

泳動装置：AE-6530 ラピダス・ミニスラブ
ゲル：E-T12.5L e・パジェル
（ゲル濃度：12.5%、ゲル厚：1 mm 厚）

泳動用緩衝液：AE-1410 EzRun
（トリス-グリシン-SDS）

通電：定電流 20 mA、70 min
試料：AE-1440 EzStandard（分子量マーカー）、
ラット骨格筋、大腸菌

染色・検出：AE-1340 EzStain Aqua
（クマシーブリリアントブルー（CBB）



泳動装置：AE-7305 型 コンパクトPAGE

ゲル：C・パジェル C12.5L

（ゲル濃度：12.5%、ゲル厚：0.75mm 厚）

泳動用緩衝液：トリス-グリシン

通電：PAGEL-High（30 min）モード

試料：タンパク質・DNA とも分子量マーカー

染色・検出：AE-1360 EzStain Silver（銀染色）

8. 電気泳動のコツ

泳動がうまくいかない時等の対処法です。きれいな泳動結果を得る為のコツでもありますので是非ご参考に！

1. ゲルがうまくできない

電気泳動できれいなデータを得る一番のコツは何と言ってもきれいなゲルを作製することです。**重合ムラ**を作らない様に以下の様な事柄に注意してみてください。

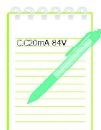
(ゲルについては「3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動」も参照ください)

問題点	原因と対策
ゲルが固まらない 重合ムラがある  ゲル化に影響する要因	ガラスプレートやコウムはきれいな物を使用する事、汚れているとゲル化し難くなります。 ゲル溶液は丁寧・充分に混ぜる事。当然均一溶液でなければ均一なゲルは出来ません。かと言って長時間又は激しく攪拌すると空気中の酸素を溶解する事になり（酸素はゲル化を阻害します）ゲル化し難い状態を招いてしまいます。手法によっては溶液類を脱気することがありますが、(等電点電気泳動のゲルを除いて) 当社の処方では脱気の必要はありません。 ゲル溶液が接している素材にも影響されます。例えばシリコン（ガスケット）に接触している部分もゲル化しにくいので、ゲル作製時にゲル底面に少し溶液が残っていても心配しないでください。 冷蔵庫から取り出した試薬（溶液）を即使用、注入すると温度ムラによるゲル化の不均一を生じる事があります。これはゲル化が温度により影響を受ける為（温かい方がゲル化し易い）です。冷暖房の風があたる所等でのゲル作製も避けた方が良いでしょう。 一般的にゲル濃度は低い方がゲル化し難く、高いほど固まり易いです。従って3～7％ぐらいの低濃度ゲルを作製する場合は上記の事項に気をつけたうえで過硫酸アンモニウム（APS）、TEMEDの量を適当量（概ね10％程度）増やして検討ください。濃縮ゲルでコウム（溝と溝の間）のゲルが出来ないことがあります、この方法で対処してみてください。 ゲル溶液の調製時に間違いがないか確認してください。ストック溶液も含めて、濃度が間違っていないか古くなっていないかも確認しておきましょう。試薬が古くなっているとゲルが固まらないことがあるので念の為確認してください。
アリの巣のような 気泡が入る	高濃度ゲルを作製した場合ゲルがガラスプレートから剥離することがあります。円形の気泡やアリの巣のような形の気泡が入っているように見えます。この時には過硫酸アンモニウム、TEMEDの量を10％程度減らしてみてください。またゲル溶液の脱気は必要ありません。

2. 泳動ができない、泳動時間がいつもと違う

泳動槽や電源装置などのハード類と操作とゲルや緩衝液（バッファー）などのソフト類に分けて原因を考えます。**泳動槽**の白金線やリード線が断線していたり、**電源装置**が故障しては当然正しい通電はされません。同様に装置を正しく使用しなければ正しい結果は出ません。ゲルや試薬、バッファー類も正しい組成で再現性のあるきれいな結果が得られるのです。

問題点	原因と対策
BPBが動かない 通電していない？	まず電流、電圧値を確認しましょう。電源装置にErrが表示されて止まっていたり、電流値が0もしくは数mA、数Vという表示になっていないか。 全く通電していない場合には泳動槽やリード線の断線、電源装置の異常等が考えられます。テスターで確認したり、他の装置に置き換えてみたり、最終的にはメーカーに相談するのが良いでしょう。 少しでも通電している場合には、操作の間違いやバッファー等の調製間違いなどの可能性があります。ガラス（ゲル）プレートやダミープレートの設置向きやバッファー量などを確認してください。電気の通り道はちゃんと出来ていますか？取扱説明書は装置の一部です。装置と一緒に保管して利用してください。安全の為に重要なことです。 バッファーは試薬の間違いや濃度が薄いと電流が流れにくくなります。心配な場合は調製し直しましょう。
いつもより泳動時間が長い、遅い 	数分～10分程度、5%程度の誤差はあまり気にしなくても問題ありません。 まず電流、電圧値を確認しましょう。いつもより電流・電圧が低ければ当然泳動時間も長くなります。例えばゲル1枚をC. C20mAで通電していて、ゲル2枚／槽で泳動する場合は40mAにしなければなりません。 泳動バッファーが漏れていないか確認してください。上下（陰陽）の電極槽はしっかり遮断されていなければなりません。 装置や操作に問題がなければ泳動・ゲルバッファー組成を確認してください。バッファーが濃いと泳動時間が長くなります。試料を大量のアプライしている場合にはその組成が影響することもあります。電気が流れ難い組成の試料溶液を大量（容量・数）にアプライしていると抵抗になることがあるようです。
いつもより泳動時間が短い、速い 	数分～10分程度、5%程度の誤差はあまり気にしなくても問題ありません。 まず電流、電圧値を確認しましょう。いつもより電流・電圧が高ければ当然泳動時間も短くなります。例えばゲル2枚／槽をC. C40mAで泳動していて、1枚で泳動する場合は20mAにしなければなりません。 装置や操作に問題がなければ泳動・ゲルバッファー組成を確認してください。バッファーが薄いと泳動時間が短くなります。電気が流れ易い組成の試料溶液を大量（容量・数）にアプライしているとその組成が影響することがあるようです。



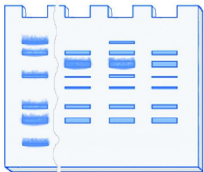
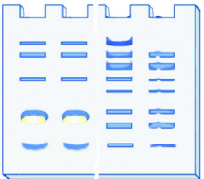
記録は残しましょう



取扱説明書は装置の一部です、大事に！

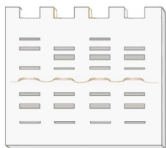
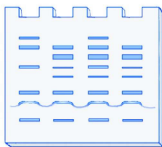
3. バンドがシャープにならない、形が変、縦筋が入る

原因はゲルをはじめいろんな要因が考えられますが、**緩衝液**（バッファー）か**試料**（サンプル）にあることが多いです。ゲル作製用緩衝液・泳動用緩衝液および試料溶液の試薬や組成、濃度をもう一度確認してみてください。

問題点	原因と対策
バンドがスメア （ブロード状） シャープにならない 	緩衝液（バッファー）か試料（サンプル）に起因することが多いです。ゲル作製用緩衝液・泳動用緩衝液の試薬や組成、濃度をもう一度確認してみてください。Laemmli 法では泳動用緩衝液の pH 調整は必要ありません。かえってイオン系がおかしくなり泳動パターン（結果）に影響を及ぼしてしまいます。同様の理由で泳動用緩衝液の再利用はお勧めできません。もともと濃縮作用の無い泳動方法ではバンドがシャープになり難いこともあるので文献等のデータと比較してみてください。試料に原因のある場合は試料溶液中の塩や界面活性剤、変性剤の影響や試料（タンパク質）の状態（分解や還元・修飾等）が考えられます。塩や界面活性剤、変性剤等の濃度が高いとバンドがスメアになったり変形したりすることがあります。例えば試料の抽出や調製の過程で大量に含まれていないか確認してください。隣の試料同士も影響するので各濃度や量（アプライのボリュームおよびタンパク質量）もなるべく揃えた方が良いでしょう。また試料の分解が起こるとバンドがスメアになります。試料が古くなっていないか保存方法は大丈夫か還元は十分か確認してみてください。分解され易い試料は抽出から泳動までなるべく短時間で、操作中は水中に置くなどして対処してください。還元処理をしている場合、還元反応が不十分だったり泳動中に再酸化（-S-S-の再結合）が起きるとバンドがシャープにならないことがあります。還元剤が古くなっていないかの確認や、2-メルカプトエタノールを使用している場合はより還元力の強い DTT に変える等してください。「4. SDS 電気泳動（Laemmli 法） 試料」も参照ください。また、低分子量（数千 Da）の試料や糖タンパク、リポタンパク等はバンドがシャープになり難い傾向にあります。比重もしっかりつけて、チップ先端がウェル底につくような丁寧なアプライを心がけましょう。
バンドの形が変 	試料溝がきれいに出来ていないとそのままの形で泳動されてしまうこともあります。未重合のアクリルアミドやゲル片が無いように試料溝の洗浄も忘れないでください。比重もしっかりつけて、丁寧なアプライを心がけましょう。試料溶液中の塩や界面活性剤、変性剤の影響や DNA、試料の分解物等が要因になることもあります。塩や界面活性剤、変性剤等の濃度が高かったり試薬が古いと泳動パターンが曲がったり、バンドが変形したりすることがあります。例えば試料の抽出や調製の過程で大量に含まれていないか確認してください。隣の試料同士も影響するので各濃度や量（塗布のボリュームおよびタンパク質量）もなるべく揃えた方が良いでしょう。
縦筋が入る 	試料が十分に溶解していない場合に見られることが多い現象です。特にウェル底部分も染色されているようであれば、溶解していない物質が大量にあるか、一旦溶解したように見えてもアグリゲーションを起こしたり、泳動時の濃縮で不溶化した物質があることが推測されます。試料調製条件を検証するか、アプライ前に遠心をして、不溶性物質を除去します。ウェル下、レーン以外の場所で縦筋が見られた場合はゲル作製時または泳動時の汚れ・コンタミが原因の可能性もあります。

4. 余計なバンドがでる

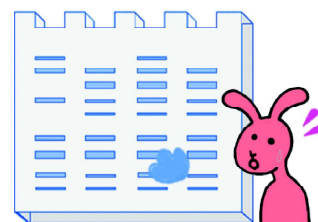
試料をアブライしていないレーンやゲル全体にもバンドが見えてしまう、という現象と同一レーンの中に???なバンドが出現する場合、バンドの形等によって要因は様々です。

問題点	原因と対策
銀染色で 余計なバンド・横筋 が出る 	試料をアブライしていないレーンやゲル全体にも横筋やバンドが見えてしまう、という現象は特に 銀染色 で発生する場合があります。これは銀染色が高感度でかつ特異性が低い(タンパク質でなくても発色する)為に起こります。ほとんどの場合、水や試薬の 汚れ (コンタミを含む)が原因です。純度の高いものを使用し溶液等を調製し直してください。ストック溶液から調製している場合は、念のためストック溶液を調製し直してみてください。他、試料処理溶液中の還元剤 2-メルカプトエタノール が原因になることもあります。ゲル下部から1/3くらいのところに横一線状に出ることが多いです。他の還元剤(DTTなど)に変更する等して対処してください。
レーン外に 余計なバンド・横筋 が出る 	水や試薬、容器の 汚れ (コンタミを含む)が原因であることがほとんどです。純度の高いものを使用し溶液等を調製し直してください。ストック溶液から調製している場合は、念のためストック溶液を調製し直してみてください。 試料アブライ時に チップ から試料がこぼれている場合もあります。試料溶液を吸ったチップを泳動用緩衝液に浸けた瞬間に試料溶液の比重によって溶液が出てきてしまうことがあります。試料アブライ時にはウェルの真上にチップを持っていき素早く真下へ差し込むようにしてチップを差し込み試料溶液を押し出すようにしましょう。 ゲルがガラスプレートから 剥離 していると試料が横筋のように広がってしまうことがあります。ゲル作製時から泳動槽のセッティング時に確認・注意してください。試料のタンパク質量が過剰の場合もゲル表面を広がる場合があります。いずれもバンド由来(バンドから広がっている)ので判断がつきます。
レーン内 余計なバンド・横筋 が出る	同一レーンの中で余計なバンドが見られる場合は試料(タンパク質)溶液由来であることがほとんどです。試料溶液へのコンタミか、タンパク質が分解していたり凝集(アグリゲーション)を起こしていたりすることも考えられます。試料溶液を調製しなおしてみてください。

5. バックグラウンドがムラ、高い

ゲルを染色してみたところ、バックグラウンドがムラになっていたり、高くなってしまった、と言う場合。もちろん染色（検出）法にもよりますが、一般的な事柄として参照ください。

問題点	原因と対策
バックグラウンド ムラ・高い	染脱色（検出）時のステップに目が行きがちですが、ゲル作製時や泳動時の水や試薬等が汚れていて原因になることもあるので、一考ください。 ゲル染脱色に使用する容器（トレイやタッパウェアなど）が清潔であるのは当然です。手もタンパク質ですので手袋等をはめ直接触らないようにしましょう。容器にはゲルが沈むと言うより溶液中に浮かぶ程度の十分量の染色液を入れ、ゲルが底に着かないように振とうします。複数のゲルを同一容器に入れる場合はこれらにさらに注意してゲル同士がくっつかないようにします。脱色時も同様です。振とうも水平回転式は液の攪拌が十分でないこともあるので出来れば他の方式の振とう器を使用しましょう。



！原因を探るヒント

まず、過程を分けて考えてみましょう。

試料調製・ゲル作製・バッファー調製・ゲルセッティング・試料アプライ・通電・染色（検出）など。

例えば通電（泳動）しなかったり、時間が速かったり遅かったりした時：試薬やゲルの調製に間違いはないか、装置の使い方に問題はないか、装置の故障はないか、など確認します。



例えば泳動結果がおかしな時：分子量マーカーや試料をアプライしたレーン全体的に泳動パターンが異常な場合は、泳動用緩衝液やゲル等全体に影響しているものが原因の可能性が高くなります。分子量マーカーは問題ない、という場合には試料（溶液）が原因の可能性が高い、と判断します。

9. 装置・システム紹介

※各装置とも仕様等の詳細はカタログをご請求下さい。試薬「ATTO Ezシリーズ」も新発売！

初めての電気泳動にもおすすめ！ 小さい、早い、省スペース、省コスト！タンパク質・核酸いずれにも対応。既製ゲル(c・パジェル)を利用して泳動～検出が2時間以内で終わります。試料処理溶液から染色液まで試薬もそろえました。

■コンパクトスラブ・スターターセット

¥244,400～

電気泳動装置（電源・泳動槽）と既製ゲル



WSE-1010 コンパクトPAGE Ace WSE-1025 コンパクトPAGE Ace Twin

c・パジェル

※コンパクトPAGE Ace Twin は
ゲル2枚用です。
いずれかを選択ください。

電気泳動用試薬類と振とう器



ATTO Ezシリーズ (試薬類)



AE-1340 EzStain Aqua



AE-1360 EzStain Silver



シーソーシェーカー-atto

～コンパクトPAGE タンパク質電気泳動システム例～

コードNo.	名 称	数量	価格
2322240	WSE-1010 コンパクトPAGE Ace	1式	¥88,000
2322245	WSE-1025 コンパクトPAGE Ace Twin	1式	¥98,000
	C-**L c・パジェル®(既製ゲル10枚)	1式	¥17000/¥19000
2323246	WSE-7020 EzProteinLadder (SDS-PAGE用有色マーカー)	1個	¥20,000
2323230	AE-1430 EzApply (SDS-PAGE用試料処理溶液)	1セット	¥6,800
2323210	AE-1410 EzRun (SDS-PAGE用泳動用バッファー)	1袋	¥4,800
2312200	WSC-2400 シーソーシェーカー-atto	1台	¥98,000
2323260	AE-1360 EzStain Silver (銀染色キット)	1セット	¥16,000
2323270	AE-1340 EzStain Aqua (クマシー染色試薬溶液)	1個	¥9,800

※ c・パジェルは各種（濃度）ございます。種類についてはお問い合わせください。グラディエントゲル付は¥2,000高です。
その他、消耗品（試薬類）などが別途必要になります。試薬「Ezシリーズ」カタログ、「7. 電気泳動実践編」参照。

※DNAの泳動のみ行なう（タンパク質の泳動を行なわない）場合には、AE-1430 EzApply、WSE-7020 EzProteinLadder、
AE-1340 EzStainAqua は必要ありません。
DNA用の泳動バッファー、マーカー、染色試薬もご用意しています。弊社までお問い合わせください。

2017/7/1



アトー株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器
開発/生産/販売/サービス

主要製品

- 発光・蛍光イメージングシステム
- 画像解析ソフトウェア ●電気泳動装置
- 電気泳動関連試薬 ●ウエスタンブロット試薬
- ペリスタポンプ ●細胞培養・観察システム

- 東京本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2 ☎(03)5827-4861(代表) ☎(03)5827-6647
- 大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1 ☎(06)6136-1421(代表) ☎(06)6365-3625
若杉センタービル別館 5F
- 技術開発センター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 ☎(03)5818-7560(代表) ☎(03)5818-7563
- ◆メンテナンスサービスグループ ☎(03)5818-7567(代表) ☎(03)5818-7563

■URL <http://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をご利用ください。