

## 等電点電気泳動法 (Isoelectric focusing)

薬品に肩についたアルファベットは、試薬の保存場所。

a 室温; b 冷蔵庫(-4 ); c 冷凍庫(-20 ); d 冷凍庫(-80 )

pH は、特に指定がない場合は、塩酸 (HCl) か水酸化ナトリウム (NaOH) であわせる。

### I. 等電点電気泳動法 1

ゲルの支持体にアガロースを用いた方法である。アクリルアミドとは異なり毒性がないこと、あるいは分子量の大きなタンパクも分離できることなどの利点がある反面、ゲルが壊れやすく取り扱いに注意を要する。この方法は、筋の全タンパクを分離しようとする場合有用である。

#### 1. 溶液

##### (1) 上部液

		最終濃度
尿素 <sup>a</sup> (Urea; 60.06)	1.2 g	4 M
チオ尿素 <sup>a</sup> (Thiourea; 76.12)	0.385 g	1 M

以上を取り、蒸留水を加え 5 ml にする。

\*使用当日に調製する。

##### (2) 電極液

###### 1) 陰極 (上)

水酸化ナトリウム<sup>a</sup> (Sodium Hydroxide; 40.00) を 0.8 g 取り、蒸留水を 100 ml 加える (最終濃度 - 0.2 M)。

###### 2) 陽極 (下)

アスパラギン酸<sup>a</sup> (DL-Aspartic Acid; 133.10) を 0.53 g 取り、蒸留水を 100 ml 加える (最終濃度 - 0.04 M)。

\*使用する当日に調製する。

\*必要な電極液の量。

ミニ泳動槽 陰極 - 100 ml, 陽極 - 100 ml

通常サイズ 陰極 - 200 ml, 陽極 - 200 ml

##### (3) 固定液

		最終濃度
100%トリクロロ酢酸 <sup>b</sup> (Trichloroacetic Acid; 163.39)	100 ml	10%
スルホサルチル酸 <sup>a</sup> (Sulfosalicylic Acid Dihydrate; 354.22)	50 g	5%

\*トリクロロ酢酸は、100%溶液 (例: 100 g 取り、蒸留水を加えて 100 ml にする) にして、冷蔵庫で保存する。

##### (4) 1%アガロース

アガロース<sup>a</sup> (Agarose-I) を 1 g 取り、蒸留水を 100 ml 加える。熱湯中に置き、完全に溶解させる。

\*冷蔵庫で保存する。

## 2. ゲルの調製

### (1) アガロースおよびソルビトールの溶解

		最終濃度
1) アガロース IEF <sup>a</sup> (Agarose IEF)	0.04 g	1%
2) ソルビトール <sup>a</sup> (D-Sorbitol; 182.17)	0.48 g	12%

以上を試験管に取り，蒸留水を 2 ml 加える．液が蒸発しないように，サラダップで試験管に蓋をし，熱湯中で溶液が完全に透明になるまで溶解する．

### (2) 尿素およびチオ尿素の添加

		最終濃度
1) 尿素 <sup>a</sup> (Urea; 60.06)	1.2 g	5 M
2) チオ尿素 <sup>a</sup> (Thiourea; 76.12)	0.3 g	0.985 M

以上を取り，アガロース IEF およびソルビトールの溶解した溶液に入れ，よく混合する．

### (3) ファルマライトの添加

尿素，チオ尿素を添加した溶液を，3 つに分け (A, N および B), 4 種類のファルマライト (Pharmalyte) を以下のように加える．

	A	N	B
	0.45 ml	1.8 ml	0.9 ml
ファルマライト <sup>b</sup>			
pH 2.5 - 5	22.5 $\mu$ l		
3 - 10		120 $\mu$ l	
4 - 6.5		60 $\mu$ l	
8 - 10.5			45 $\mu$ l

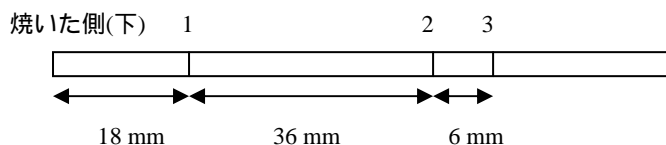
\*ガラス管へ溶液を注入すると，ファルマライトの最終濃度は，以下ようになる．

ファルマライト	最終濃度
2.5 - 5	0.476%
3 - 10	3.636%
4 - 6.5	1.818%
8 - 10.5	1.428%

### (4) ガラス管への注入

#### 1) 毛細管

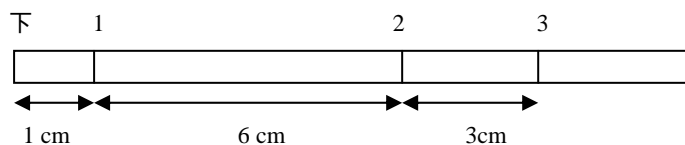
- 毛細管の下部をガスバーナで焼き，内径をやや小さくする．
- 下記のようにマジックで印をつける．



- まず，B 液を 1 まで，次に N 液を 2 まで，最後に A 液を 3 まで入れる．  
\*毛細管現象を利用する．

2) ガラス管 (内径 2 mm × 長さ 13 cm)

- a マジックで下記のように印をつける。



- b 透析膜<sup>a</sup>を蒸留水に浸し一重にした後、輪ゴムを用い、液が漏れないようにセットする。

- c 注射器を用い、A 液を 1 まで、次に N 液を 2 まで、最後に B 液を 3 まで入れる。  
\*空気が入らないよう注意する。

(5) ゲルの保存

1) 毛細管の場合

乾燥を防ぐため、シャーレに湿らしたろ紙を敷き、その上に毛細管を水平に置き、冷蔵庫で 1 晩保存する。

2) ガラス管の場合

立てた状態で、冷蔵庫で 1 晩保存する。数日置く場合は、乾燥を防ぐために、パラフィルムで蓋をする。

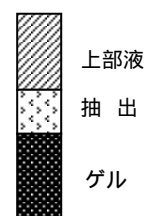
\*その日のうちに使用する場合は、ゲルが固まるのに最低 3 時間かかるので、それ以上置くこと。

\*乾燥しなければ、数日間は保存できる。

3. 試料の添加

- (1) 試料としては、40 倍で尿素抽出したもの (抽出 p 1) あるいは筋小胞体用に抽出したもの (抽出 p 7) を用いる。これを毛細管の場合は 10 μl 程度、ガラス管の場合は 30 ~ 40 μl 程度ゲルの上にのせる。

- (2) 試料の上に上部液 (1. - (1)) を管が完全に充たされるまで入れる (左図)。



4. 通電

ミニゲルでは、200 V で 1 時間、その後 400 V で 1 時間、通常サイズでは、700 V で 3 時間、その後 1500 V で 1 時間通電する。

注意：通電は冷蔵庫で行う。

5. 固定および洗浄

- (1) ゲルを取り出し固定液<sup>b</sup>に浸し、数分置く。  
(2) タンパクが可視化されたら、固定液を捨て蒸留水を入れ数分洗浄する。  
(3) 蒸留水を SDS sample buffer<sup>b</sup> (SDS 電気泳動法 p 2 参照) に換え、さらに数分置く。

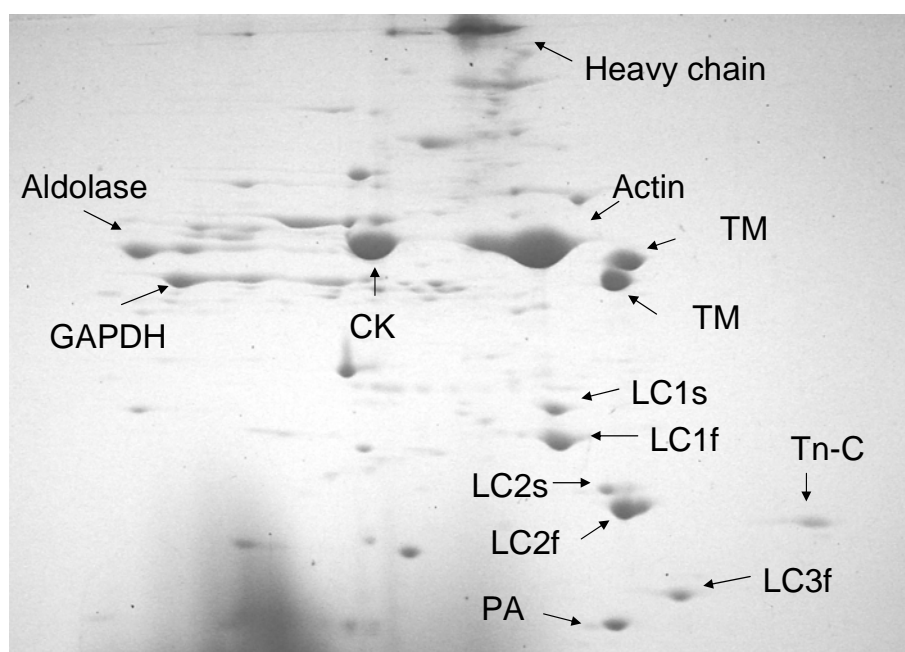
注意：固定液に浸した状態で、一晩冷蔵保存してもよい。

泳動後直ちに二次元目の泳動に入る場合は、固定をする必要は無い。

## 6. SDS 電気泳動

- (1) 1%アガロース<sup>b</sup>をネット中に置き，融解する．
  - (2) ゲルをスタッキングゲルの上に置く．
  - (3) 1%アガロースをゲルにかけ，ゲルを固定する．
- 注意：セパレイティングゲルは，15%アクリルアミドのものを用いる．  
スタッキングゲルは，上端ぎりぎりまでのせる．

二次元電気泳動例（ラット外側広筋）



TM, tropomyosin; Tn, troponin; LC, light chain; CK, creatine kinase; GAPDH, glyceral dehyde-3-phosphate dehydrogenase; PA, parvalbmin

## II. 等電点電気泳動法 2

ここで述べる方法は、アクチン、トロポミオシン、ミオシン軽鎖などを分離するのに有用である。

### 1. 溶液

(1) 上部液 等電点電気泳動 1 と同じものを使用する (p 1 – (1)) .

#### (2) 電極液

##### 1) 陰極液 (上)

水酸化ナトリウム<sup>a</sup> (Sodium Hydroxide; 40.00) を 0.16 g 取り, 蒸留水を 10 ml 加える (最終濃度 – 40 mM) .

##### 2) 陽極液 (下)

リン酸<sup>a</sup> (Phosphoric acid) を 0.115 ml 取り, 蒸留水を 100 ml 加える .

注意: 必要量は p 1 参照 . スラブミニゲルでは, 陰極 – 100 ml, 陽極 – 300 ml 必要 .  
冷蔵庫でストックしておいてもよい .

#### (3) 0.23% TEMED

TEMED<sup>b</sup> (N, N, N', N' – tetramethylethylenediamine; 116.21) を 0.23 ml 取り, 蒸留水を  
加え 100 ml にする (冷蔵庫でストックする) .

#### (4) 40% 過硫酸アンモニウム (APS)

過硫酸アンモニウム<sup>a</sup> (Ammonium peroxodisulfate; 228.20) を 0.4 g 取り, 蒸留水を 1 ml  
加える .

注意: APS は, 水分を吸収するといたみやすい . 分注して使用し, 蓋にはパラフィルム  
をかける .  
溶液は数日なら, 冷蔵庫でストックできる .

#### (5) 40% アクリルアミド (AA)

アクリルアミド<sup>b</sup> (Acrylamide; 71.08) を 40 g 取り, 蒸留水を加え 100 ml にする (冷蔵  
庫で保存) .

#### (6) 2% ビスアクリルアミド (Bis)

メチレンビスアクリルアミド<sup>b</sup> (N, N'-methylene-bis (acrylamide); 154.17) を 2 g 取り,  
蒸留水を加え 100 ml にする (冷蔵保存) .

## 2. ゲルの調整

### (1) ゲル溶液の作成

				最終濃度	
a.	40% AA <sup>b</sup>	0.43 ml	0.86 ml	1.72 ml	4.3%
b.	2% Bis <sup>b</sup>	0.2 ml	0.4 ml	0.8 ml	0.029%
c.	0.23% TEMED <sup>b</sup>	0.5 ml	1.0 ml	2.0 ml	0.1%
d.	アンフォライン pH 3.5-10 <sup>b</sup>	0.02 ml	0.04 ml	0.08 ml	0.5%
e.	アンフォライン pH 5-8 <sup>b</sup>	0.064 ml	0.128 ml	0.256 ml	1.6%
f.	尿素 <sup>a</sup> (Urea; 60.06)	1.92g	3.84 g	7.68 g	8 M
g.	蒸留水	1.04 ml	2.08 ml	4.16 ml	
h.	40% APS <sup>b</sup>	0.005 ml	0.01 ml	0.02 ml	0.05%
		計 4 ml	計 8 ml	計 16 ml	

a~g までを混合した後, h を加える.

### (2) ゲル溶液の注入

ディスクゲルでは注射器を, スラブゲルではピペットを用い, 溶液を注入する. 空気が入らないよう注意する.

注意: 尿素が析出するので, 冷蔵庫ではなく室温で保存する.

数日間なら保存可能.

乾燥しないよう蒸留水をゲルの上に注入し, パラフィルムをかける.

## 2. 試料の添加 p 3 参照.

## 3. 通電

ミニディスクゲルおよびミニスラブゲルでは, 100 V で 20 分間, その後 300 V で 80 分間, 通常サイズでは, 700 V で 3 時間, その後 1500 V で 1 時間通電する.

## 4. 固定および洗浄 p 3 参照

注意: SDS-IM に浸す必要はない.

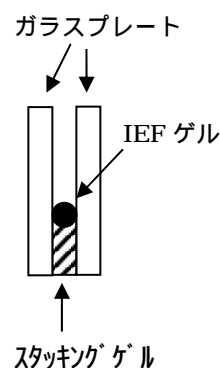
## 5. SDS 電気泳動

左図のようにゲルをスタッキングゲルの上におく.

注意: アガロースでとめる必要はない.

スタッキングゲルと IEF ゲルの間に空気が入らないようにする.

SDS 電気泳動のプレートの暑さは, 通常サイズでは 2 mm を, ミニサイズでは 1 mm とする.



### III. 等電点電気泳動方 3 (rehydrate gel)

この方法では、作成したゲルを長期間保存しておくことが可能であり、サンプル数が多いときなどに有用である。

#### 1. 溶液

- (1) 40% アクリルアミド (AA) p 5 参照
- (2) 2% ビスアクリルアミド (Bis) p 5 参照
- (3) 40% 過硫酸アンモニウム (ASP) p 5 参照
- (4) 0.25 M Tris/HCl, pH 8.4  
トリス<sup>a</sup> (Tris; 121.14) を 6.21 g 取り、蒸留水を約 150 ml 加える。pH を 8.4 に合わせた後、さらに蒸留水を加え、全体を 200 ml にする (冷蔵保存)。
- (5) 70% グリセロール  
グリセロール<sup>a</sup> (glycerol; 92.09) 350 ml に、蒸留水 150 ml を加える (室温保存)。

#### (6) Rehydration 溶液

		最終濃度
1) 尿素 <sup>a</sup> (Urea; 60.06)	4.8 g	8 M
2) Ampholine, pH 3.5-10 <sup>b</sup>	0.7 ml	7%

以上を取り、蒸留水を加え 10 ml にする。

#### (6) 電極液

##### 1) 陰極液

水酸化ナトリウム<sup>a</sup> (Sodium Hydroxide; 40.00) を 0.2 g 取り、蒸留水を加え 10 ml にする (最終濃度 - 0.5 M)。

##### 2) 陽極液

リン酸<sup>a</sup> (Phosphoric acid) を 0.49 ml 取り、蒸留水を加え 10 ml にする (最終濃度 - 0.5 M)。

#### 2. ガラスプレートの組み立て

- (1) ガラスプレートに蒸留水を数滴たらし、ゲルボンド<sup>b</sup>を置く。

注意： ゲルボンドは、hydrophobic side (上で覆われており、水をたらすと水が粒にならず、広がる側) とゲルとが接するように置く。

Basic ampholyte (pH > 8.0) を含むゲルでは、ゲルボンドとゲルとの粘着力が弱まることもある。その時は、APS の濃度を 0.07% に、また TEMED の濃度を 0.1% に増加する。

ガラス面とゲルとの粘着力が高まることがあるので、時々、Repel-Silane ES (17-1332-01) でゲルと接するガラス面を洗浄する。

### 3. ゲルの調整

#### (1) ゲル溶液の作成

		最終濃度	
a.	40% AA <sup>b</sup>	1.965 ml	3.93%
b.	2% Bis <sup>b</sup>	1.25 ml	0.125%
c.	0.25 M Tris/HCl (pH 8.4) <sup>b</sup>	0.5 ml	6.25 M
d.	70% glycerol <sup>a</sup>	1.243 ml	4.35%
e.	TEMED <sup>b</sup>	0.01 ml	0.05%
f.	蒸留水	15.012 ml	
e.	40% APS <sup>b</sup>	0.02 ml	0.04%
計 20 ml			

注意：TEMED, N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine; 116.21

(2) a~f までを混合した後, e を加える。

(3) 空気が入らないよう注意しながら, ゆっくりと溶液をガラスプレートに注入する。その後, 溶液の上に蒸留水を数滴のせる。

### 4. ゲルの乾燥

(1) ゲルを蒸留水の中に入れゆっくりと揺らすことにより, ゲルを洗浄する。これを 20 分間 2 回行う。

(2) 2% グリセロールで, 20 分間 1 回洗浄する。

(3) 1 晩, 乾燥機の中で乾燥させる (45 )。

(4) サランラップをかけ, ゲルをカッターで数 mm 幅に切る。

(5) -20 で保存する。

### 5. Rehydration

10 ml のメスシリンダーに Rehydration 溶液を入れ, その中にゲルを室温で 1 晩置く。

### 6. 通電

(1) プレートを 10 に冷却する。

(2) ろ紙を電極液で濡らし, 左図のようにゲルの上に置く。

(3) ろ紙をゲルの陰極側に置く。

(4) サンプルを 20~30  $\mu$ l ろ紙の上にのせる。

(5) 500 V (8 mA, 8 W) で 20 分間, 2000 V (14 mA, 14 W) で 90 分間, 最後に 2500 V (14 mA, 18 V) で 10 分間通電する。

