

# ピロリン酸電気泳動法

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); c 冷凍庫(-20 °C); d 冷凍庫(-80 °C)

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。

この方法は、isomyosin を分離するためのものである。

## 1. 溶液の調整

(1) 100 mM ニリン酸ナトリウム (PPNa) (ピロリン酸ナトリウム)

ニリン酸ナトリウム<sup>a</sup> (Sodium diphosphate decahydrate; 446.06) を 44.6 g 取り、蒸留水を約 800 ml 加える。pH を 8.5 に合わせた後、蒸留水を加え全体を 1000 ml にする。

注意：PPNa は溶け難いので、十分攪拌すること。

ゲル溶液用は冷蔵庫で、buffer 用は室温で保存する。

(2) 0.5 M タウリン

タウリン<sup>a</sup> (Taurine; 125.1) を 12.5 g 取り、蒸留水を加え 200 ml にする(冷蔵保存)。

注意：冷蔵庫中で析出するが、そのまま使用してもよい。

(3) 100 mM 塩化マグネシウム

塩化マグネシウム<sup>a</sup> (Magnesium chloride, hexahydrate; 203.30) を 10.17 g 取り、蒸留水を加え 500 ml にする。

注意：ゲル溶液用は冷蔵庫で、buffer 用は室温で保存する。

(4) 40% アクリルアミド (AA) SDS ポリアクリルアミド電気泳動法 p 1 参照

(5) 2% ビスアクリルアミド (Bis) SDS ポリアクリルアミド電気泳動法 p 1 参照

(6) 70% グリセロール SDS ポリアクリルアミド電気泳動法 p 5 参照

(7) 40% 過硫酸アンモニウム (APS) SDS ポリアクリルアミド電気泳動法 p 1 参照

(8) PPAGE sample buffer

		最終濃度
1) 100 mM PPNa <sup>b</sup>	25 ml	25 mM
2) EGTA (380.4) <sup>a</sup>	76 mg	2 mM
3) 70% グリセロール <sup>a</sup>	35.7 ml	25%
5) ブロムフェノールブルー <sup>a</sup> (Bromophenol blue; 669.99)	20 mg	0.02%

以上を取り、蒸留水を加え 100 ml にする (冷蔵保存)。

注意：単一筋線維を取り扱うときは、グリセロールの濃度 (最終濃度) を 50% に高めたものを使用する。

## 2. ゲル溶液の調整

### (1) ゲル溶液の作成

		最終濃度
a.	100 mM PPNa <sup>b</sup> 40 ml	26.7 mM
b.	0.5 M タウリン <sup>b</sup> 4.5 ml	15 mM
c.	70%グリセロール <sup>a</sup> 17.14 ml	8%
d.	100 mM 塩化マグネシウム <sup>b</sup> 7.5 ml	5 mM
e.	蒸留水 56.76 ml (60.385 ml)	
f.	40%AA <sup>b</sup> 15 ml (13.125 ml)	4% (3.5%)
g.	2%Bis <sup>b</sup> 8.5 ml (6.75 ml)	0.11% (0.09%)
h.	TEMED <sup>b</sup> 0.375 ml	0.25%
i.	40%APS <sup>b</sup> 0.225 ml	0.06%
計 150 ml		

注意：TEMED, N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine; 116.2

a ~ h までを混合し，固める前に i を加える．

### (2) 溶液を冷却し，40%APS を加えた後，ガラスプレートに流し込む．

注意：前日に作成し，1 晩置いてから使用する．

## 3. 泳動 buffer の調整

### (1) 溶液の作成

			最終濃度
a.	100 mM PPNa <sup>a</sup> 2.0 L	0.8 L	40 mM
b.	100%グリセロール <sup>a</sup> 0.4 L	0.16 L	8%
c.	EGTA <sup>a</sup> or EDTA <sup>a</sup> 4g / 3.72 g	1.6 g / 1.49 g	2 mM
d.	100 mM 塩化マグネシウム <sup>b</sup> 0.15 L	0.06 L	3 mM
e.	蒸留水 2.45 L	0.98 L	
計 5 L		計 2 L	

注意：前日に作成し，冷蔵庫に入れ冷却しておく．

## 4. 通電

### (1) 冷却装置を - 8 ~ - 10 に設定し，泳動 buffer が - 2 ~ 2 になるようにする．

### (2) 120 V で 30 分間予備泳動を行う．

### (3) 抽出液 (抽出 p 2) を 10 ~ 20 $\mu$ l のせる．

注意：銀染色を行う場合，3 ~ 5  $\mu$ g のタンパクが必要．

二次元電気泳動で，ミオシン重鎖を分離しようとする場合，5  $\mu$ g のタンパクが必要．

二次元電気泳動で，ミオシン軽鎖を分離しようとする場合，20 ~ 40  $\mu$ g のタンパクが必要．

(4) 2-メルカプトエタノール<sup>b</sup> (2-mercaptoethanol; 78.14) を上のタンクに 0.5 ml , 下のタンクに 1 ml 加える .  
注意 : 必ずサンプルをつんだ後 , 加えること .

(5) 11520 Vh (120 V, 96 時間) 通電する .

泳動例

