

SDS ポリアクリルアミド電気泳動法

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 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. 15% アクリルアミドゲル電気泳動

この SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) は、筋に含まれる全タンパクの分離を行うための方法である。その中でも、ミオシン軽鎖、パルプアルブミン、トロポニン、トロポミオシン、アクチン、クレアチンキナーゼなどが、明瞭に分離される。

1. 溶液の調整

(1) 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8

トリス^a(Tris; 121.14) を 90.75 g取り、蒸留水を約 400 ml加える。pHを 8.8 に合わせ、蒸留水を加え全体を 500 mlにする (冷蔵保存)。

(2) 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8

トリス^a(Tris; 121.14) を 30.25 g取り、蒸留水を約 400 ml加える。pHを室温で 6.8 に合わせた後、蒸留水を加え全体を 500 mlにする (冷蔵保存)。

(3) 40% アクリルアミド (AA)

アクリルアミド^b (Acrylamide; 71.08) を 40 g取り、蒸留水を加え 100 mlにする (冷蔵保存)。

(4) 2% ビスアクリルアミド (Bis)

メチレンビスアクリルアミド^b (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)。

(5) 40% 過硫酸アンモニウム(APS)

過硫酸アンモニウム^a (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。

(6) Running buffer

- | | |
|--|---------|
| 1) Tris ^a (Tris; 121.14) | 30.28 g |
| 2) グリシン ^a (Glycine; 75.07) | 143.1 g |
| 3) SDS ^a (Sodium dodecylsulfate ; 288.38) | 10g |

以上を取り蒸留水を加え 1000 ml にし, これを室温で保存する. 10 倍に希釈し, 使用する (最終濃度: Tris – 25 mM, glycine – 191 mM, SDS – 0.1%).

(7) 10% SDS

SDS^aを 10 g取り, 蒸留水を加え 100 mlにする (室温保存).

注意: 気温が低いと SDS が析出することがある. その場合はぬるま湯につけて溶かした後, 使用する.

(8) SDS sample buffer

		最終濃度
1) 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8 ^b	12.5 ml	62.5 mM
2) SDS ^a	2 g	2%
3) グリセロール ^a (glycerol; 92.09)	10 ml	10%
4) 2-メルカプトエタノール ^b (2-mercaptoethanol; 78.14)	5 ml	5%
5) ブロムフェノールブルー ^a (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).

2. ゲルの調整

(1) Separating ゲル溶液の作成

				最終濃度	
a.	40%AA ^b	15 ml	30 ml	45 ml	15%
b.	2%Bis ^b	8 ml	16 ml	24 ml	0.4%
c.	1.5 M Tris/HCl, pH 8.8 ^b	10 ml	20 ml	30 ml	375 mM
d.	10%SDS ^a	1.6 ml	3.2 ml	4.8 ml	0.4%
e.	TEMED ^b	0.04 ml	0.08 ml	0.12 ml	0.1%
f.	蒸留水	5.32 ml	10.64 ml	15.96 ml	
g.	40%APS ^b	0.04 ml	0.08 ml	0.12 ml	0.04%
		計 40 ml	計 80 ml	計 120 ml	

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

40 ml でノーマルサイズゲル (厚さ 1 mm) 2 枚分, ミニゲル 4 枚分

a~f までを混合し, 固める前に g を加える.

(2) Stacking ゲルの作成

				最終濃度	
a.	40%AA ^b	0.75 ml	1.5 ml	2.25 ml	3.0%
b.	2%Bis ^b	0.4 ml	0.8 ml	1.2 ml	0.08%
c.	0.5 M Tris/HCl, pH 6.8 ^b	2.5 ml	5.0 ml	7.5 ml	125 mM
d.	10%SDS ^a	0.2 ml	0.4 ml	0.6 ml	0.2%
e.	TEMED ^b	0.01 ml	0.02 ml	0.03 ml	0.1%
f.	蒸留水	6.115 ml	12.23 ml	18.345 ml	
g.	40%APS ^b	0.025 ml	0.05 ml	0.075 ml	0.1%
		計 10 ml	計 20 ml	計 30 ml	

注意： a~f までを混合し, 固める前に g を加える.

3. プレートへの注入

- (1) 空気が入らないよう注意しながら, ピペットを使用しゆっくりSeparatingゲル溶液を注入する. その後, 溶液の上に蒸留水を数滴のせる.

注意： Separatingゲルが固まった状態で, 2日程度保存してもよい. その際, ゲルが乾燥しないように, 蒸留水を多めにのせておく.

- (2) ゲルが固まったら, 上部に残った溶液を捨て, その上にStackingゲル溶液を注入する. その後, 溶液の上に蒸留水を数滴のせる.

注意： サンプルコームを使用する場合は, 蒸留水をのせる必要はない.

4. 通電

- (1) ガラスプレート泳動槽に取り付ける。
- (2) Running buffer を陽極および陰極に入れる。
- (3) ゲルの下端に空気が入った場合は、ピペットで取り除く。
- (4) サンプルを Stacking ゲルにのせる。
- (5) マーカーがゲルの下端に泳動されるまで、通電する。

注意：通電は室温で行う。

電流は、以下の値を目安にする。

Stacking ゲル ミニ - 20 mA, ノーマル - 30 mA

Separating ゲル ミニ - 30 mA, ノーマル - 50 mA

II. 7%アクリルアミドゲル電気泳動

この SDS-PAGE は、ミオシン重鎖（分子量約 200,000 Da）のアイソフォームを分離するためのものである。

1. 溶液の調整

(1) 1 M Tris/ 0.5 M glycine , pH 8.6 (TG, pH 8.6)

1) トリス^a(Tris; 121.14) を 60.57 g , グリシン^a (Glycine, 75.07) を 18.76 g取り , 蒸留水を約 400 ml加える . 混合した後 , 冷蔵庫に数時間置く .

注意 : pH メーターも冷蔵庫に入れ , 作業は全て冷蔵庫の中で行う .

2) pH を冷蔵庫の中で 8.6 に合わせる .

注意 : 塩酸を入れると水温が上昇し , pH が変化する . 温度が 5 ~ 6 に低下するのを待って , 再び pH を調節する .

3) 蒸留水を加え , 500 ml にする .

冷蔵庫で保存する .

(2) 0.5 M Tris/HCl , pH 6.8 p 1 参照

(3) 40% アクリルアミド (AA) p 1 参照

(4) 2% ビスアクリルアミド (Bis) p 1 参照

(5) 40% 過硫酸アンモニウム(APS) p 1 参照

(6) 70%グリセロール

グリセロール^a (glycerol; 92.09) 350 mlに . 蒸留水 150 mlを加える (室温保存) .

(7) Running buffer p 1 参照

(8) 10% SDS p 1 参照

(9) SDS sample buffer p 1 参照

2. ゲルの調整

(1) Separating ゲル溶液の作成

				最終濃度	
a.	40%AA ^b	5.95 ml	11.9 ml	17.85 ml	6.8%
b.	2%Bis ^b	3.18 ml	6.36 ml	9.54 ml	0.18%
c.	TG pH 8.6 ^b	7 ml	14 ml	21 ml	Tris 200 mM Gly 100 mM
d.	70%グリセロール ^a	15 ml	30 ml	45 ml	30%
e.	10%SDS ^a	1.4 ml	2.8 ml	4.2 ml	0.4%
f.	TEMED ^b	0.035 ml	0.07 ml	0.105 ml	0.1%
g.	蒸留水	2.391 ml	4.782 ml	7.173 ml	
h.	40%APS ^b	0.044 ml	0.088 ml	0.132 ml	0.05%
		計 35 ml	計 70 ml	計 105 ml	

注意：TEMED, N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine; 116.21
35 ml でノーマルサイズゲル (厚さ 0.75 mm) 2 枚分。
a~g までを混合し、固める前に h を加える。

(2) Stacking ゲルの作成

				最終濃度	
a.	40%AA ^b	0.75 ml	1.5 ml	2.25 ml	3.0%
b.	2%Bis ^b	0.4 ml	0.8 ml	1.2 ml	0.08%
c.	0.5 M Tris/HCl, pH 6.8 ^b	2.5 ml	5.0 ml	7.5 ml	125 mM
d.	10%SDS ^a	0.2 ml	0.4 ml	0.6 ml	0.2%
e.	TEMED ^b	0.01 ml	0.02 ml	0.03 ml	0.1%
f.	蒸留水	6.115 ml	12.23 ml	18.345 ml	
g.	40%APS ^b	0.025 ml	0.05 ml	0.075 ml	0.1%
		計 10 ml	計 20 ml	計 30 ml	

注意：a~f までを混合し、固める前に g を加える。

3. プレートへの注入

(1) プレートおよび Separating ゲルを冷蔵庫中に 30 分ほどおき、十分冷却する

(2) 空気が入らないよう注意しながら、ピペットを使用しゆっくり Separating ゲル溶液を注入する。その後、溶液の上に蒸留水を数滴のせる。

注意：Separating ゲルが固まった状態で、2 日程度保存してもよい。その際、ゲルが乾燥しないように、蒸留水を多めにのせておく。

(3) ゲルが固まったら、上部に残った溶液を捨て、その上に Stacking ゲル溶液を注入する。その後、溶液の上に蒸留水を数滴のせる。

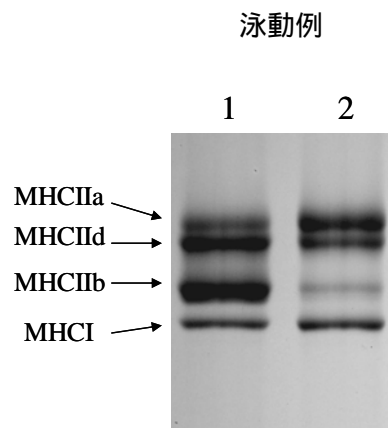
注意：サンプルコームを使用する場合は、蒸留水をのせる必要はない。

(4) ガラスプレートを乾燥機中 (45) に約 30 分間置き、ゲルを十分固める。

4. 通電

- (1) ガラスプレート泳動槽に取り付ける。
- (2) Running buffer を陽極および陰極に入れる。
- (3) ゲルの下端に空気が入った場合は、ピペットで取り除く。
- (4) サンプル (抽出 p 1, p 2 および p 7 参照) を Stacking ゲルにのせる。
- (5) 通電は、以下のように行う。
ノーマル - 7860 Vh (160 V, 48 時間)
ミニ - 2300 Vh (120 V, 19 時間)

注意：通電は冷蔵庫中で行う。



III. 10% アクリルアミドゲル電気泳動

このSDS-PAGE は、分子量約 100,000 Da前後のタンパク(筋小胞体Ca²⁺-ATPaseなど)を分離するためのものである。

1. 溶液の調整

- (1) 1 M Tris/ 0.5 M glycine , pH 8.6 (TG, pH 8.6) p 5 参照
- (2) 0.5 M Tris/HCl , pH 6.8 p 1 参照
- (3) 40% アクリルアミド (AA) p 1 参照
- (4) 2% ビスアクリルアミド (Bis) p 1 参照
- (7) 40% 過硫酸アンモニウム(APS) p 1 参照
- (8) 70%グリセロール p 5 参照
- (7) Running buffer p 1 参照
- (8) 10% SDS p 1 参照
- (9) SDS sample buffer p 1 参照

2. ゲルの調整

(1) Separating ゲル溶液の作成

				最終濃度	
a.	40%AA ^b	10 ml	20 ml	30 ml	10%
b.	2%Bis ^b	2 ml	4 ml	6 ml	0.1%
c.	TG pH 8.6 ^b	8 ml	16 ml	24 ml	Tris 200 mM Gly 100 mM
d.	70%グリセロール ^a	2.857 ml	5.714 ml	8.571 ml	5%
e.	10%SDS ^a	1.6 ml	3.2 ml	4.8 ml	0.4%
f.	TEMED ^b	0.04 ml	0.08 ml	0.12 ml	0.1%
g.	蒸留水	15.453 ml	30.906 ml	46.359 ml	
h.	40%APS ^b	0.05 ml	0.1 ml	0.15 ml	0.05%
		計 40 ml	計 80 ml	計 120 ml	

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

40 ml でノーマルサイズゲル (厚さ 1 mm) 2 枚分 .

a ~ g までを混合し , 固める前に h を加える .

(2) Stacking ゲルの作成

				最終濃度	
a.	40%AA ^b	0.75 ml	1.5 ml	2.25 ml	3.0%
b.	2%Bis ^b	0.4 ml	0.8 ml	1.2 ml	0.08%
c.	0.5 M Tris/HCl, pH 6.8 ^b	2.5 ml	5.0 ml	7.5 ml	125 mM
d.	10%SDS ^a	0.2 ml	0.4 ml	0.6 ml	0.2%
e.	TEMED ^b	0.01 ml	0.02 ml	0.03 ml	0.1%
f.	蒸留水	6.115 ml	12.23 ml	18.345 ml	
g.	40%APS ^b	0.025 ml	0.05 ml	0.075 ml	0.1%
		計 10 ml	計 20 ml	計 30 ml	

注意： a ~ f までを混合し , 固める前に g を加える .

3. プレートへの注入

(1) プレートおよび Separating ゲルを冷蔵庫中に 30 分ほどおき , 十分冷却する

(2) 空気が入らないよう注意しながら , ピペットを使用しゆっくり Separating ゲル溶液を注入する . その後 , 溶液の上に蒸留水を数滴のせる .

注意： Separating ゲルが固まった状態で , 2 日程度保存してもよい . その際 , ゲルが乾燥しないように , 蒸留水を多めにのせておく .

(3) ゲルが固まったら , 上部に残った溶液を捨て , その上に Stacking ゲル溶液を注入する . その後 , 溶液の上に蒸留水を数滴のせる .

注意：サンプルコームを使用する場合は , 蒸留水をのせる必要はない .

(4) ガラスプレートを乾燥機中 (45) に約 30 分間置き , ゲルを十分固める .

4. 通電

- (1) ガラスプレートを泳動槽に取り付ける．
- (2) Running buffer を陽極および陰極に入れる．
- (3) ゲルの下端に空気が入った場合は，ピペットで取り除く．
- (4) サンプルを Stacking ゲルにのせる．
注意： 筋小胞体Ca²⁺-ATPaseを分離する場合（染色，クーマシーブリリアントブルー），
20～30 μgのタンパクが必要となる．精製した筋小胞体（抽出 p 7）を用いるな
らば，SDS sample buffer (SDS電気泳動法 p 2) で5倍に希釈し，20～30 μlの
せる．
- (5) マーカーがゲルの下端に泳動されるまで，通電する．

注意： 通電は冷蔵庫中で行う．

電流は，以下のように行う．

ノーマル（厚さ1 mm） - 900 Vh