

# ゲルの染色方法

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. クーマシーブリリアントブルーR

### 1. 溶液

#### (1) 45%メタノール/10%酢酸

メタノール<sup>a</sup> (Methanol; 32.04)                      900 ml

酢酸<sup>a</sup> (Acetic acid; 60.05)                         200 ml

以上を取り、蒸留水を加え 2 L にする (室温保存)。

#### (2) 0.25%クーマシーブリリアントブルー (CBB) 溶液

クーマシーブリリアントブルー R (Coomassie brilliant blue R; 826.0) を 2.5 g 取り、45%メタノール/10%酢酸 1000 ml を加える (室温保存)。

注意：CBB は溶けにくい。半日ほど搅拌を続ける。

### 2. 染色手順

(1) ゲルをパッドに入れ、0.25% CBB 溶液をゲルが完全につかるように注ぐ。

(2) 数時間～1晩、容器ごとゆっくり揺らし放置する。

(3) 0.25% CBB 溶液をビンに戻す。

注意：0.25% CBB 溶液は繰り返し使用できる。1晩置いても十分染色されない場合は、新しい溶液に換える。その場合は、もう一度(2)を行う。

この時点では、ゲルは全体が濃いブルーに染まり、タンパクを識別することはできない。CBB が肌が付くとなかなか取れない。手袋を使用すること。

(4) 蒸留水を入れ、ゲルを洗浄するとともに、パッド内部に付着した CBB を手でこするようにして、はがし落とす。

注意：CBB が付着したままだと、染色むらができることがある。

(5) 45%メタノール/10%酢酸を入れ、揺らしながら放置する (脱色)。

(6) 45%メタノール/10%酢酸がブルーになったら、新しい溶液と交換する。

注意：最初は 30 分ほどで交換する。

ブルーになった 45%メタノール/10%酢酸は、捨てずに容器にためておく。容器の中に JK ワイパーを入れ、容器ごとゆらしておくと、繰り返し使用できる。

(7) 十分脱色されたら、蒸留水に交換する。

## II. ピクリン酸クーマシーブリリアントブルーR 染色

この方法は、バックがきれいに抜けることおよび脱色を蒸留水でできることに特徴がある。

### 1. 溶液

- (1) 45%メタノール/10%酢酸<sup>a</sup> p 1 参照
- (2) 0.1 M ピクリン酸ナトリウム<sup>a</sup>

ピクリン酸ナトリウム (Sodium picrate monohydrate; 269.1) を 26.9 g 取り, 蒸留水を約 800 ml 加える。攪拌しながらピクリン酸ナトリウムが完全に溶けるまで, 水酸化ナトリウムを少しずつ加える。溶解したら蒸留水を加え, 全体を 1000 ml にする (室温保存)。

注意: ピクリン酸ナトリウム (粉末) は, 爆発する危険性があるので, 熱したり, 急激な力を加えたりしてはならない。

### (4) 染色液

0.1 M ピクリン酸ナトリウム <sup>a</sup>	300 ml
0.25% CBB 溶液 <sup>a</sup> p 1 参照	100 ml

以上を混合する (室温保存)。

### 3. 染色手順

- (1) ゲルをパッドに入れ, 45%メタノール/10%酢酸<sup>a</sup>に浸し, パッドを揺らしながら 30 分間から 1 晩放置する。
- (2) 溶液を 0.1 M ピクリン酸ナトリウム<sup>a</sup>に換え, 30 分間放置する。

注意: 0.1 M ピクリン酸ナトリウムは, 繰り返し使用する。

- (3) 溶液を染色液<sup>a</sup>に換え, 十分染色されるまで放置する。

注意: 染色液は, 繰り返し使用する。

- (4) 蒸留水で洗浄する。

注意: 30 分 ~ 1 時間毎に蒸留水を交換する (水が黄色くなくなるまで)。

### III. クーマシーブリリアントブルーG

この方法は、短時間で染色できる方法である。

#### 1. 溶液

##### (1) クーマシーブリリアントブルー (CBB) 溶液

		最終濃度
クーマシーブリリアントブルー R (Coomassie brilliant blue G 250; 854.03)	0.2 g	0.04%
60% 過塩素酸 (Perchloric acid; 100.46)	29.2 ml	3.5%

以上を取り、蒸留水を加え 500 ml にする。

#### 2. 染色手順

- (1) ゲルをパッドに入れ、0.25% CBB 溶液をゲルが完全につかるように注ぐ。
- (2) パッドを揺らしながら、数分間放置する。
- (3) タンパクが可視化されたら、CBB 溶液を蒸留水に換える。

注意： 10～15 分でバンドが見えてくる。それ以上かかるようだと、CBB 溶液が古くなっている可能性が高い。  
新鮮な CBB 溶液は、薄い茶色である。溶液が古くなると青味がかかった色になる。  
CBB 溶液は、繰り返し使用する。

## IV. 銀 染 色

CBB 染色より，10 倍以上感度が高い染色方法である．

### 1. 保存溶液の調整

#### (1) 固定液 1

45%メタノール/10%酢酸 (染色 p 1 参照)

#### (2) 染色原液 A

28% アンモニア <sup>b</sup> (Ammonia solution; 17.03)	56 ml
水酸化ナトリウム <sup>a</sup> (Sodium hydroxide; 40.00)	4 g

以上を取り，蒸留水を加え 200 ml にする (冷蔵保存)．

#### (3) 染色原液 B

硝酸銀<sup>a</sup> (Silver nitrate; 196.89) を 31 g 取り，蒸留水を加え 200 ml にする (冷蔵保存)．

#### (4) 現像原液

クエン酸 <sup>a</sup> (Citric acid, anhydrous; 192.12)	240 mg
35%ホルムアルデヒド液 <sup>b</sup> (Formaldehyde solution; 30.03)	2.16 ml

以上を取り，蒸留水を加え 200 ml にする (冷蔵保存)．

### 2. 溶液の調整 (当日)

#### (2) 固定液 2

25% グルタルアルデヒド溶液<sup>b</sup> (Glutaraldehyde solution; 100.12) を 4 ml 取り，蒸留水を加え 100 ml にする (最終濃度 1%)．

注意：濃度は，必ずしも正確でなくてもよい．

ゲル 1 枚につき，50～100 ml あれば染色可能．

#### (3) 染色液

染色原液 A<sup>b</sup> を 5 ml，染色原液 B<sup>b</sup> を 5 ml 取り，蒸留水を加え 100 ml にする．

#### (4) 現像液

現像原液<sup>b</sup> を 5 ml 取り，蒸留水を加え 100 ml にする．

### 3. 染色手順

- (1) ゲルを固定液 1<sup>a</sup>に浸し、揺らしながら 15 分間以上置く。

注意：ゲルは直接手では触れない。手袋を使用すること。  
できれば、30 分間以上固定液に漬ける。  
一晩そのままにしてもよい。  
容器はきれいなものを用いる。使用する前にエタノールでよく拭くとよい。

- (2) ゲルを固定液 2 に、15 分間以上浸す。

注意：できれば、30 分間以上置く。

- (3) 固定液を蒸留水に換え、5 分間以上置くことによりゲルを洗浄する。これを 3 回行う。

注意：できれば、1 回 10 分間以上置く。洗浄時間が短すぎると、バックが濃くなりすぎることもある。

- (4) 染色液に、約 15 分間浸す。

注意：染色時間は、温度により異なる。横からみてゲルがやや茶色にみえるようになったら、終了してもよい。

- (5) (3)と同じ要領で、洗浄を 3 回行う。

- (6) 現像液に浸す。

注意：タンパクが可視化されなかった場合は、蒸留水で数十秒洗浄し、(4)からの作業を繰り返す。(4)でタンパクが染色されたら、溶液をすて蒸留水に換え、さらに酢酸を加える。

- (7) 適度に染色されたら、現像液に酢酸 (Acetic acid; 60.05) を数滴加え、反応を止める。

- (8) (7)の状態为数十分間置いた後、溶液を蒸留水に換える。