

アクリルアミドゲルによるタンパク質の分離

タンパク質電気泳動用緩衝液

Laemmli緩衝液システム（トリス-グリシン）は非連続性緩衝液システムであり、幅広い分子量をもつタンパク質を鮮明に分離する目的で広く使用されています。このシステムではゲルがトリス塩酸緩衝液で調整され、トリス-グリシンが泳動緩衝液として使用されます。

トリス-トリシン緩衝液システムでは泳動緩衝液中でトリシンがグリシンに置き換わります。結果的に、より効率的なスタッキングとデスタッキング、タンパク質とペプチドの高い分解能が低分子量で実現します（10 kDa ~ 15 kDa 以下）。PAGEr™GoldプレキャストゲルなどのLaemmliゲルを用いて短時間で高い信頼性の分離を行なう場合、またはPAGEr™EXプレキャストゲルusProSieve™EX泳動緩衝液を使用する場合は、298~317 ページを参照してください。

Buffer Preparation Tris-Glycine SDS Buffer, pH 8.3

10x Stock solution	g/l for 10X Stock solution
.25 M Tris base	30.3 g Tris Base
1.92 M Glycine	144.0 g Glycine
1.0% SDS*	Adjust volume to 1 liter with distilled water

(1X = 25 mM Tris base, 192 mM Glycine, 0.1% SDS*)
*Omit SDS if running native proteins.

Tris-Tricine SDS Buffer, pH 8.3

10x Stock solution	g/l for 10X Stock solution
1 M Tris base	121.1 g Tris base
1 M Tricine	179.0 g Tricine
1.0% SDS*	Adjust volume to 1 liter with distilled water

(1X = 100 mM Tris base, 100 mM Tricine, 0.1% SDS*)
*Omit SDS if running native proteins.

2X Tris-Glycine SDS Sample Buffer

2X concentrate	amount to add for 2X concentrate
126 mM Tris-HCl, pH 6.8	2.5 ml of 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8
20% Glycerol	2 ml Glycerol
4% SDS	4 ml of 10% SDS
0.005% Bromophenol blue	0.5 ml of 0.1% Bromophenol blue
Adjust volume to 10 ml with distilled water	

(1X = 63 mM Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 0.0025% Bromophenol blue, 2.5% β ME)

アクリルアミドゲルによるタンパク質の分離

続き

ポリアクリルアミドゲルでのタンパク質充填と泳動

ゲルに載せるタンパク質量は、サンプルの純度や使用される染色方法によって異なります。高度に精製されたタンパク質であれば、一般的にミニゲルのレーン毎のタンパク質の分量は0.5 µg ~ 5 µgで十分です。細胞溶解物のような完全な混合物には、レーン毎に50 µgのタンパク質が必要となる場合があります。以下の表では、タンパク質検出のための検出限界値を示しています。

タンパク質染料の検出限界

タンパク質染色	検出下限 [タンパク質/バンド]
Coomassie® Blue Stain	100 ng
Silver Stain	1 ng
SYPRO® Orange Protein Gel Stain	1 ng–2 ng
SYPRO® Red Protein Gel Stain	1 ng–2 ng
SYPRO® Tangerine Protein Gel Stain	4 ng–8 ng
ProSieve™ Safe Stain	8ng–15ng

NOTE: Limits are based on optimal detection methods for each stain.

最適電圧と電力設定

トリスグリシンポリアクリルアミドのミニゲルは通常125~200ボルトの定電圧で泳動します。電気泳動中、電流は低下し発熱は弱まります。電圧が高すぎるまたは上限を設定しない場合、過熱が生じてバンドの歪曲やゲルおよび装置の損傷を招くおそれがあります。定電圧によって、1つの装置で複数のゲルに同じ電圧を適用できます。定電圧を使用する場合はゲルの厚さは問題となりません。大型のゲルでは、定電流設定で泳動用予定電圧よりもわずかに高く（5ボルト）電圧の上限を設定することによりサンプル移動速度を維持することもできます。

トリス-グリシンSDSの代わりに1×ProSieve™EX泳動緩衝液を使用すると、バンドの解像度を維持しながらも、200~250Vという高電圧でより迅速にポリアクリルアミドのミニゲルを泳動することができます。

PAGEr™EXゲルおよび1×ProSieve™EX泳動緩衝液を用いれば、スピードと解像度を最大化することができます。

最適な電気泳動時間

プロモフェノールブルー染色がゲル下部に移動するまで電気泳動を行ってください。電気泳動時間は、使用される緩衝液、ゲル長およびポリアクリルアミド濃度によって異なります。一般的にミニゲルは泳動に約30~90分かかります。一方、大型のゲルでは5時間にも及ぶことがあります。トリス-グリシンSDSの代わりに1×ProSieve™EX泳動緩衝液を使用すると、バンドの解像度を維持しながらも、200~250Vの高電圧で泳動時間を15分間にまで短縮して泳動することができます。

PAGEr™EXゲルおよび1×ProSieve™EX泳動緩衝液を用いれば、スピードと解像度を最大化することができます。