

等電点電気泳動法

ここで紹介する方法は、アナテック社の等電点電気泳動装置（クールホテスター二次元電気泳動装置）を使用した方法を紹介する。

準備する試薬類

ゲルストリップ

イモビライズドストリップ（GE ヘルスケアバイオサイエンス（株））もしくは IPG レディストリップ（日本バイオラッドラボラトリーズ（株））を使用。目的に合った pH レンジや長さを選ぶこと。

抽出液 1（可溶化しやすい試料用）

尿素	0.51g
10%(w/v) SDS	0.02g
10%(v/v) Triton X-100	0.20ml
dithiothreitol (DTT)	0.01g
Pharmalyte（ゲルストリップの pH に合わせる）	0.02ml
（プロテアーゼインヒビター	適量）

以上を MiliQ 水で 1.00 ml にメスアップする

※ プロテアーゼインヒビターは必要に応じて使用する。

抽出液 2 (膜タンパク質などを含む試料用)

尿素	0.30g
チオ尿素	0.15g
20%(w/v) CHAPS	0.10ml
20%(w/v) SB3-10	0.10ml
dithiothreitol (DTT)	0.01 g
Pharmalyte (ゲルストリップの pH に合わせる)	0.02ml
(プロテアーゼインヒビター	適量)

以上を MiliQ で 1.00 ml にメスアップする

※ プロテアーゼインヒビターは必要に応じてご使用する。

膨潤液 (ゲルストリップ 4 本分)

尿素	7.2g
チオ尿素	3.04g
20%(v/v) Triton X-100	2.0ml
dithiothreitol (DTT)	0.04 g
Pharmalyte (ゲルの pH に合わせる)	0.2ml
0.1M 酢酸	0.5ml
0.1%(w/v) Orange G	0.5ml

以上を MiliQ で 20ml にメスアップする

※ ゲルストリップ 1 本当たり約 5ml の膨潤液が必要。

SDS 処理液 (ゲルストリップ 4 本分)

尿素	7.26g
dithiothreitol(DTT)	0.10g
0.5M Tris-HCl, pH6.8	1.0ml
10%(w/v)SDS	4.0ml
0.1%(w/v)BPB	0.5ml
60%(v/v)グリセロール	10.0ml

※ ゲルストリップ 1 本当たり約 5ml の SDS 処理液が必要。

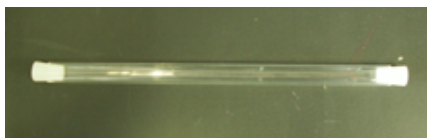
還元アルキル化処理液 (ドライストリップ 4 本分)

0.5M Tris-HCl, pH6.8	1.0ml
10%(w/v)SDS	4.0ml
0.1%(w/v)BPB	0.5ml
60%(v/v)グリセロール	10.0ml
MiliQ	4.5ml
iodoacetamide	0.9g

※ ゲルストリップ 1 本当たり約 5ml の還元アルキル化処理液が必要。

使用する機器類

ゲルストリップ膨潤器



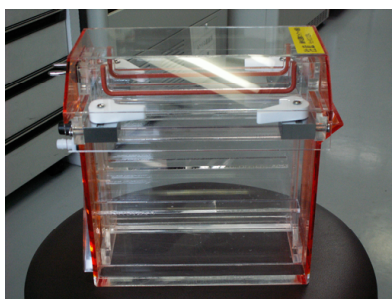
等電点電気泳動槽



パワーサプライ



SDS-PAGE 電気泳動槽



実験方法

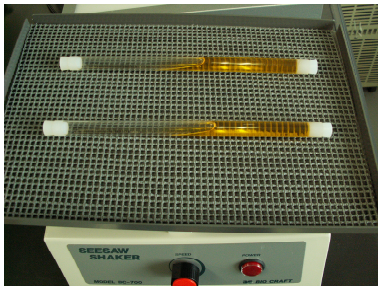
1 日目：ゲルストリップの膨潤

- 1-1. ゲルストリップ膨潤液（用事調製）を作製する。
- 1-2. ゲルストリップ膨潤容器に、5ml ずつの膨潤液を入れる。
- 1-3. ゲルストリップの保護シートをゆっくりと剥がし、ゲル面を上にして 1 本ずつ個別にゲルストリップ膨潤容器にセットする。

保護シート方が薄いので区別できる



- 1-4. 振とうしながら一晩膨潤する（最低でも 10 時間は必要）。



*ゲルストリップ膨潤容器を使用した場合、転がりやすいので注意すること。膨潤後のゲルストリップは保存不可。

2 日目：等電点電気泳動（一次元目）

- 2-1. 泳動装置の温度を一定に保つために、電子冷却タイプ（Type-P）の電源

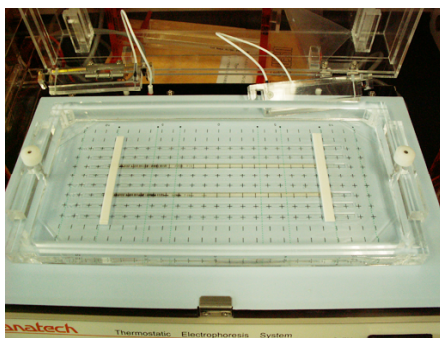
を入れ、サーキュレータータイプ (Type-C) は、外部循環を始める。

- 2-2. 電極トレーに少量のシリコンオイルを入れて、トレー底面とゲルストリップ保持板との間に空気を入れないようにセットする。
- 2-3. ゲルストリップ膨潤容器からゲルストリップを取り出し、ろ紙上で 1 分程度立てて余分な膨潤液を取り除く。



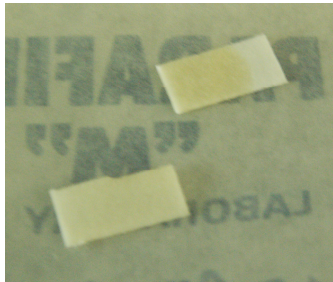
- 2-4. ゲルストリップ保持板にゲルストリップを平行に並べる。ゲルストリップにはセットする向きがあり、ゲルストリップに“+”と記載されている方を、電極トレーの左側 (電極+側) に向くようにする。
- 2-5. 電極用ろ紙に蒸留水を染み込ませ、余分な蒸留水を取り除き、ゲルストリップの両端に 3mm ほどかかるようにセットする。

*アルカリ側のろ紙には DTT (5mg/ml)を染み込ませるとアルカリ側のスポットのフォーカシングが改善されることがある。

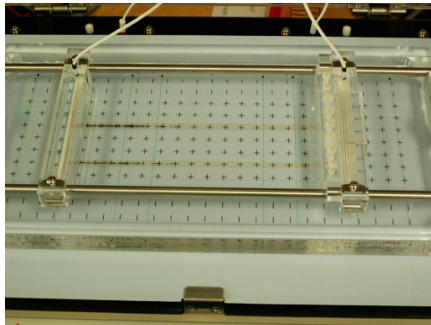


- 2-6. サンプル塗布用ろ紙に 1 枚あたり 15 μ l 程度のサンプルを染み込ませて、

ゲルストリップのアルカリ側にセットする。セットする位置は、電極用ろ紙から少し離れた位置に置く。サンプル量を増やす場合は、別のサンプル塗布用ろ紙にサンプルを吸着させて、先にセットしたサンプル塗布用ろ紙に重ねてセットする。



- 2-7. 電極用ろ紙の中央に来るように、電極ホルダーをセットする。
- 2-8. 試料塗布用ろ紙を複数枚使用している場合は、サンプル押さえるアタッチメントを電極ホルダー上部にセットする。
- 2-9. 電極トレーにゆっくりとシリコンオイルを流し込む。ゲルストリップ、電極用ろ紙、サンプル塗布用ろ紙が、完全に大気から遮断されていることを目視で確認する。



2-10. パワーサプライと泳動装置を接続して、ゲルストリップの長さ、及び pH に該当するプログラム電気泳動を開始する。

* 18cm ゲルを使用した場合のプログラム

Step	Voltage	Time
1	500V	2h
2	700V	1h
3	1000V	1h
4	1500V	1h
5	2000V	1h
6	2500V	1h
7	3000V	1h
8	3500V	10h
9	500V	

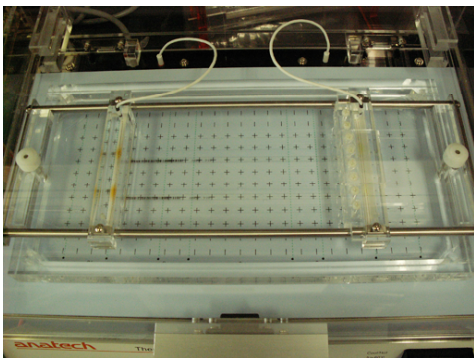
Step9 まできたら泳動終了。

2-11. 電気泳動開始後 15 分たったら、次の 2 点を確認する。

- ① 電流値を確認する。泳動するゲルの本数によるが、電流値が 15 分後に 0 ~0.2mA になっていると良い。電流値が高いとサンプルに含まれる塩濃度が高い場合がある。なかなか電流値が下がらない場合は、泳動の途中にろ紙を交換すると効果的な場合もある。



- ② ゲルストリップ膨潤液に含まれる色素が、+極側に移動しているか確認する。色素が移動していない場合はセッティングに問題があり、電圧がゲルストリップにかかっていない場合がある。



2-13. スラブ泳動用のゲルを作製する。

スラブ泳動を行なう前日に、スラブ泳動用のゲルを作製する。スラブゲルは、室温にて一晩静置して重合する。特に大きいゲルの場合は、一晩重合した方がきれいなスポットデータが得られやすい。

3 日目：SDS-PAGE 電気泳動（二次元目）

- 3-1. 蒸留水を入れたバット（ゲルストリップが入るサイズ）、SDS 処理液、還元アルキル化処理液を用意する。

※ 質量分析を行わない場合、還元アルキル化処理液は必要ない。

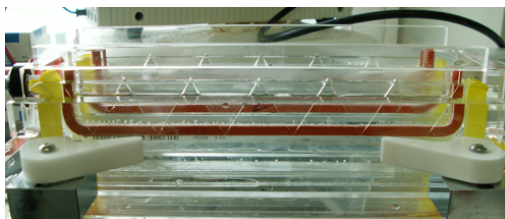
- 3-2. SDS 処理液を、ゲルストリップ膨潤容器に 5ml ずつ入れる。

- 3-3. プログラム泳動が終了 (Step9 の段階でストップする) したことを確認し、

パワーサプライの電源を切り、念のために接続ケーブルも外す。

※ 通電を止めると同時にタンパク質の拡散が始まるので、SDS 処理までの作業は素早く、正確に行うこと。

- 3-4. 電極トレーからゲルストリップを取り出して、蒸留水を入れたバットの中で数秒すすぎ、シリコンオイルを洗い流す。
- 3-5. ゲルストリップを SDS 処理液が入っているゲルストリップ膨潤容器に、1本ずつ入れ 30 分振とうする（還元アルキル化処理を行わない時は 50 分振とうする）。
- 3-6. 質量分析を行なう場合は還元アルキル化処理液中でさらに 20 分振とうする。
- 3-7. 前日準備した SDS-PAGE 電気泳動用のゲル上面に、気泡に気をつけながらゲルストリップを載せる。ゲルストリップが長い場合は、両端をはさみで切り落とす。
- 3-8. アガロースゲルもしくはシャーケームを使用して、ゲルストリップを固定する。アガロースゲルを使用する場合、前もって作成した液をヒートブロックで再溶解し、ゲルが固まらない程度に温度が下がってから封入する。



- 3-9. SDS-PAGE 電気泳動ゲルを泳動装置にセットして、SDS-PAGE 電気泳動を開

始する。開始直後は1枚あたり10mA程度にし、20~30分程たったら一度電源を切り、シャークコームを抜いて再度泳動を開始する。このときの電流値は1枚あたり40mA程度までにする。きれいな像を得たい場合はゆっくり泳動した方が良い。

- 3-10. BPB (SDS 処理液、還元アルキル化処理液に含まれる) が、スラブゲルの下面まで移動したら、パワーサプライの電源を切る。
- 3-11. 電気泳動後のゲルは蛍光染色、銀染色もしくは CBB 染色を行ない、スポットの分離状態を確認する。

※ あまりおすすめないが等電点電気泳動が終了したゲルストリップは、 -80°C で数ヶ月間の保存が可能である。ただし、解凍時などにサンプルが拡散する恐れがあるので、SDS 処理液で15分処理し、ゲルストリップのみで保存する。SDS-PAGE 電気泳動を行なう前にゲルストリップを取り出して、SDS 処理液の残りの15分から実験を再開する。

本法はアナテック社および老人研・二次元電気泳動マニュアル (http://proteome.tmig.or.jp/2D/J_2DEmethod.html) を参考とした。