

# ラピダス・ミニスラブ<sup>®</sup>電気泳動槽

2-5400-01

## 操作の流れ

試薬の準備

試料の準備

ゲル作製

泳動槽の準備

電源装置の準備

通電・泳動 (二次元電気泳動)

固定・染色・脱色

ゲル前処理

通電・泳動

固定・染色・脱色

装置洗浄

## 周辺装置

本装置を用いて電気泳動を行う場合には、次の機器及び試薬が必要となります。

ラピダス・ミニスラブゲル作製キット AE-6401

## 電源装置

パワーステーション 500VC 500V / 200mA AE-8270

パワーステーション1000VC 1000V / 500mA AE-8450

パワーステーション1000XP 1000V / 500mA / 200W AE-8750

## ゲル乾燥機 (ゲルを乾燥保存する場合)

ラピドライ 有効ゲルサイズ 450 × 380mm AE-3750

ラピドライミニ 有効ゲルサイズ 200 × 190mm AE-3711

マイルドライ 有効ゲルサイズ 175 × 175mm × 2枚 AE-3770

## 紫外線照射装置 (核酸を蛍光検出する場合)

AB-1500シリーズ各種

フィルター寸法 200 × 200mm 波長312nm DT-20MP

フィルター寸法 200 × 200mm 波長254nm DT-20CP

PAGEL (パジェル):既製ポリアクリルアミドゲル AE-6000

## PAGゲル付着ハンドリングフィルム (レクタンゲルの場合)

ゲルサポート AE-3350

## 真空ポンプ (ゲル化溶液を脱気する場合)

バキューポンプ AE-3725

## ゲル剥離剤 (レクタンゲルの場合)

Repel-Silane (1850-252,ファルマシア社製)

SI GMACOTE (SL-2,シグマ社製)

## 電気泳動用試薬

電気泳動用または純度の高い試薬を準備します。

Laemmli法  
 アクリルアミド  
 N,N'-メチレンビスアクリルアミド  
 過硫酸アンモニウム  
 N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン  
 トリスヒドロキシメチルアミノメタン  
 グリシン  
 ドデシル硫酸ナトリウム  
 塩酸  
 グリセリン  
 酢酸  
 メタノール  
 クマシープリリアントブルーG-250又はR-250  
 2-メルカプトエタノール  
 プロムフェノールブルー

核酸泳動用  
 アクリルアミド  
 N,N'-メチレンビスアクリルアミド  
 過硫酸アンモニウム  
 N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン  
 トリスヒドロキシメチルアミノメタン  
 硼酸  
 蔗糖  
 エチレンジアミン四酢酸・2Na (EDTA/2Na)  
 エチジウムブロマイド

二次元電気泳動  
 水溶性タンパク質 (未変成)  
 アクリルアミド  
 N,N'-メチレンビスアクリルアミド  
 過硫酸アンモニウム  
 N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン  
 トリスヒドロキシメチルアミノメタン  
 グリセリン  
 キャリアアンフォライト (Ampholine, Pharmalite ファルマシア社製など)  
 スルホサリチル酸  
 トリクロロ酢酸  
 メタノール  
 酢酸  
 クマシープリリアントブルーG-250又はR-250  
 水酸化ナトリウム  
 燐酸  
 塩酸  
 グリシン  
 プロムフェノールブルー  
 アガロース

O'Farrell法  
 尿素 (特に純度の高い試薬を準備します。)  
 Nonidet P-40 (NP-40)  
 Ampholine pH3-10  
 Ampholine pH5-7  
 2-メルカプトエタノール  
 アクリルアミド  
 N,N'-メチレンビスアクリルアミド  
 過硫酸アンモニウム  
 N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン  
 トリスヒドロキシメチルアミノメタン  
 燐酸  
 水酸化ナトリウム  
 塩酸  
 ドデシル硫酸ナトリウム  
 グリセリン  
 アガロース  
 グリシン  
 プロムフェノールブルー  
 トリクロロ酢酸  
 スルホサリチル酸  
 クマシープリリアントブルーG-250  
 酢酸

## 本装置によるタンパク質の泳動方法

## (1) 試薬の準備

①ゲル作製用：SDS電気泳動法（Leamml i法）  
ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を用いる泳動法ではタンパク質の高次構造は保持されません。タンパク質の高次構造を保持したまま分離を行いたいときには、SDSを除いて試薬を準備してください。

A溶液（30% アクリルアミド保存液）  
アクリルアミド 29.2g  
N,N'-メチレンビスアクリルアミド 0.8g  
純水に溶解し100mlとします。 冷暗所保存

B溶液（1.5M Tris-Hcl緩衝液 pH8.8）  
トリスヒドロキシメチルアミノメタン（Tris） 18.2g  
ドデシル硫酸ナトリウム（SDS） 0.4g  
塩酸（Hcl） 2.0ml  
純水に加え100mlとします。 冷暗所保存

C溶液（0.5M Tris-Hcl緩衝液 pH6.8）  
トリスヒドロキシメチルアミノメタン（Tris） 6.1g  
ドデシル硫酸ナトリウム（SDS） 0.4g  
塩酸（Hcl） 4.2ml  
純水に加え100mlとします。 冷暗所保存

D溶液（10%過硫酸アンモニウム）  
過硫酸アンモニウム 100mg  
純水1mlに溶解します。 使用時調整

②泳動槽（上部、下部槽）用緩衝液  
トリスヒドロキシメチルアミノメタン（Tris） 1.5g（25mM）  
ドデシル硫酸ナトリウム（SDS） 0.5g（0.1%）  
グリセリン 7.2g（192mM）  
純水で500mlとします。HclでのpH調整は行いません。 冷暗所保存

③マーカー色素（BPB）溶液  
ブロムフェノールブルー（BPB） 1 mg  
グリセリン 0.1ml  
純水 0.9ml 冷暗所保存

④染色（クマジーブリリアントブルー）液  
クマジーブリリアントブルー 1g  
メタノール 300ml  
酢酸 100ml  
純水 600ml  
ろ紙でろ過してから使用します。 密閉保存

⑤脱色液  
メタノール 300ml  
酢酸 100ml  
純水 600ml 密閉保存

⑥試料処理液  
ドデシル硫酸ナトリウム（SDS） 0.1g（1%）  
2-メルカプトエタノール 0.1ml（1%）  
C溶液（0.5M Tris-Hcl緩衝液pH6.8） 1ml（50mM）  
グリセリン 2ml（20%）  
純水で10mlとします。 冷暗所保存

## (2) 試料の準備

SDSゲルで泳動する場合には試料のSDS処理を行います。乾燥した試料の場合は、タンパク質濃度が1~2mg/mlになるよう試料処理液に溶解した後、室温から徐々に温度を上昇させ100℃で1~2分間加熱処理した溶液を泳動用試料とします。溶液状試料の場合は試料処理時の終濃度を正確に合わせ、さらに希薄試料の場合には処理時の希釈を防ぐために、直接試料溶液に処理用の試薬を加える方法も行えます。

例）血清を試料とする場合（総タンパク質濃度6g/dlの時）

チューブに血清を20μLとります。  
純水を570μL加えます。  
10%SDS溶液を100μL加えます。  
2-メルカプトエタノールを10μL加えます。  
C溶液を100μL加えます。  
グリセリンを200μL加えます。  
チューブにシールをし水浴で徐々に温度を上げ、沸騰後1~2分したら水浴中から引き上げます。

タンパク質の高次構造を保持するようSDSを用いない泳動を行う場合も、タンパク質の濃度は1~2mg/mlとしますが、試料処理液にはSDSと2-メルカプトエタノールは加えません。また、泳動槽用緩衝液にもSDSは加えません。

## (3) ゲル作製

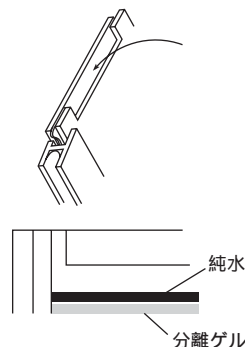
ゲル組成表（ミニスラブ2枚用、単位はml）

	分離ゲル						濃縮ゲル
	5%	7.5%	10%	12.5%	15%	20%	4.5%
A溶液	3	4.5	6	7.5	9	12	0.9
B溶液	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	
C溶液							1.5
D溶液	0.08	0.08	0.08	0.08	0.06	0.06	0.02
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
純水	10.5	9	7.5	6	4.5	1.5	3.6

TEMED：N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン  
実験台上に立てたプレート間に一旦コウムをいれ、コウム先端から5~6mm下に分離ゲル溶液を満たすレベルを油性ペンで記入します。  
記入後コウムは取り除きます。

A溶液、B溶液（またはC溶液）と純水を上記の組成表に示された量とり混合した後、TEMEDとD溶液を添加し穏やかに混合します。

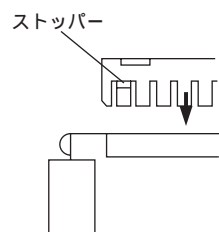
ガラスプレートMAB-10(2-5406-01)を上側としてプレートを傾け調製した分離ゲル溶液を印を付けた位置まで流し込みます。



純水を分離ゲル溶液上に2~3mmの高さに重層し放置します。約1時間で重合は終了します。

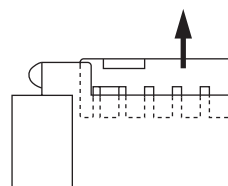
重合終了後、重層した純水を捨てます。調製した濃縮ゲル溶液を少量分離ゲルの上に注ぎ、ゲル上端を洗浄します。

濃縮ゲル溶液をプレート上端まで入れます。気泡をつけずにサンプルコウムを、プレートとコウムのストッパーが着くまで差し込みます。約30分静置する事で重合が終了します。



## (4) 泳動槽の準備

濃縮ゲル重合後コウムを左図の矢印の方向に押し上げて抜き取ります。



調製した泳動槽用緩衝液の少量を作製された溝に注ぎ、未重合のアクリルアミドを流し去り溝を洗浄します。