

蛍光検出基礎知識 検出の達人への道③ SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Key Word : ポリアクリルアミド、SDS-PAGE、SDS

現在、SDS ポリアクリルアミド電気泳動はタンパク質の電気泳動方法で最も使われている方法の一つです。

原理

SDS (Sodium dodecyl sulfate) -ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、目的タンパク質の高次構造を変性して分子量の違いにより分離する手法です。ポリアクリルアミドゲルはアガロースに比べて架橋構造が細かいことから、より小さい分子の分離が可能で、100～200 kDa以下のタンパク質やポリペプチド、短い核酸断片を分離するのに適しています。操作が簡便で再現性が高いので、タンパク質の電気泳動では最もよく用いられている手法です。通常は、泳動サンプルの調製時にβ-メルカプトエタノールやDTT (Dithiothreitol)などの還元剤を添加してタンパク質のS-S結合(ジスルフィド結合)を切断します。SDSは、水溶性タンパク質1gあたり約1.4g結合するとされており、SDS-タンパク質複合体を形成します。SDSの結合分子数だけタンパク質分子に負電荷を加えるため、電気泳動によりポリペプチド分子を分子量に従って分離することができます(図1)。SDSは強力な陰イオン界面

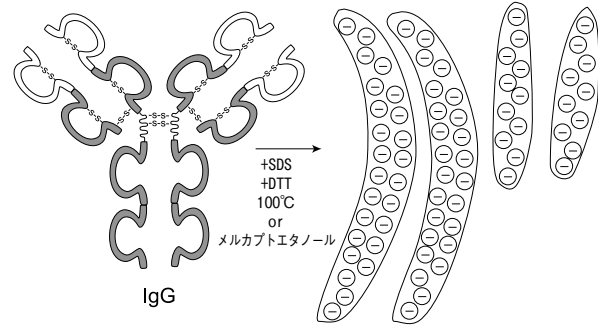


図1. SDS処理されたIgG

活性剤なので、膜タンパク質などの不溶性タンパク質の可溶化にも適しています。

良好な結果を得るためのKey Point

分子量マーカーの選択

分子量マーカーの移動度から得られた検量線をもとに、目的タンパク質の分子量を算出します。正確な分子量測定には色素が結合していないマーカー(スタンダードマーカー)

M. (kDa)

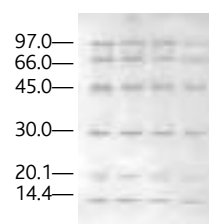


図2. SDS-PAGEのパターン

縦型ミニゲル電気泳動装置(Mighty-Small Mini-vertical unit)を用いてSDS-PAGEを行いました。サンプルはLaemmli系のサンプルバッファーでLow Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresisを等倍希釈して、アクリルアミドゲル(15 %T、2.7 %C)にそれぞれ3 μl添加しました。電気泳動は、20 mAの定電流で、55分間行ないました。泳動後のゲルは、CBBで染色しました。

表1. タンパク質分画に必要なポリアクリルアミドゲル濃度

分画範囲(kDa)	アクリルアミド濃度(%)
36～205	5%
24～205	7.5%
14～205	10%
14～66*	12.5%
14～45*	15%

* 分子量の大きなタンパク質はゲルに入りにくい場合があります。

表2. SDS-PAGE(図3)における各タンパク質の分子量と相対的移動度

Protein	Mr(Da)	Rf
Phosphorylase b	97,000	0.07
Albumin	66,000	0.13
Ovalbumin	45,000	0.25
Carbonic anhydrase	30,000	0.67
Trypsin inhibitor	20,100	0.67
α-Lactalbumin	14,000	0.89



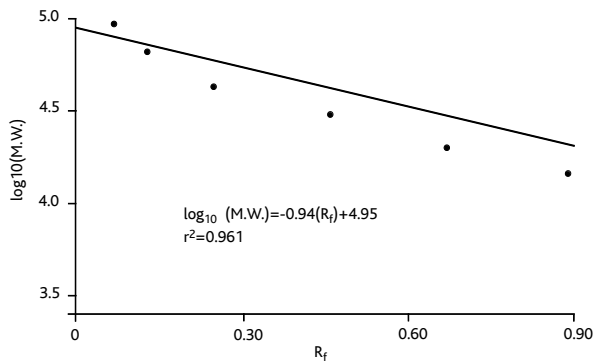


図3. SDS-PAGEによる選択曲線

表1の数値から、最小二乗法で選択曲線の式を求めました。

を用います。有色マーカー（マーカータンパク質に異なる色素を結合）は、泳動状態の確認やSDS-PAGE後のメンブレンへのプロットング効率の確認に有効ですが、蛍光検出を行う場合には結合している色素によっては強いシグナルを発生し、解析の妨げとなることがあるので注意が必要です。

ゲル濃度の選択

分離するタンパク質の分子量に対応したポリアクリルアミドゲル濃度（ポアサイズ）を選択することが重要です。（ゲル濃度と泳動可能なタンパク質分子量との関係は表1参照）

電気泳動装置の選択

スクリーニング目的には泳動距離の短いミニゲル用泳動装置、分離度を高め大きく展開するには泳動距離が長く大きなゲルが泳動できる装置を選択します。さらに、ゲル作製の手間を省き再現性に優れた結果を得るにはプレキャストゲルの使用が有効です。発熱によるバンドの歪みを抑えるために、ゲル全面を冷却できる電気泳動装置を用います。

サンプル調製方法

サンプル中の塩濃度をなるべく下げ、サンプル間の塩濃度差を小さくします。フレッシュなサンプルバッファー保存液（-20℃保存）を使用して、タンパク質の変性を完全に行います。不完全な変性はアーチファクトの原因になります。

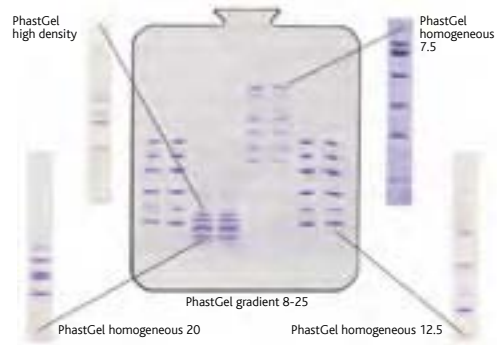


図4. PhastGelのグラジエントゲルとホモジニアスゲルの分画範囲

ホモジニアスゲルは、近接したタンパク質バンドの距離を広げ分離を向上することができます。

中央のゲル：PhastGel gradient 8-25 サンプル：

レーン1、2、7、8 LMW Marker Kit（コード番号17-0446-01）

レーン3、4 PMW*

レーン5、6 HMW SDS Marker Kit（コード番号17-0615-01）

* PMWは現在販売していません。

分子量の測定法

図2は分子量既知のタンパク質分子量マーカーをSDS-PAGEした結果です。それぞれのタンパク質の移動度を表2に示します。移動度は先行色素（プロモフェノールブルー）をR_f = 1.00とした相対的移動度で表しています。分子量の対数と移動度との間には良好な直線関係が認められます（図3）。分子量マーカーと同一スラブゲル上にサンプルを展開することで、サンプル中のタンパク質の分子量を推定することができます。

ポリアクリルアミドゲル濃度の選択

分離できる分子量分画範囲はポリアクリルアミドゲルの濃度によって決まります。精度の高い解析を行うには、目的タンパク質のバンドがゲル中央付近に位置するようにゲル濃度を選択します。ゲルには濃度勾配を持つグラジエントゲルとゲル濃度が均一なホモジニアスゲルがあります。サンプルの分子量分布を調べる場合、もしくは、サンプルタンパク質の分子量が広範囲にわたる場合は、グラジエントゲルを用います。分子量の近いタンパク質を分離するには、濃度が均一なホモジニアスゲルを用います（図4、5）。グラジエントゲルとホモジニアスゲルを組み合わせることでシステムチックにサンプルの分子量分布を解析できます（ツールボックスアプローチ法）。

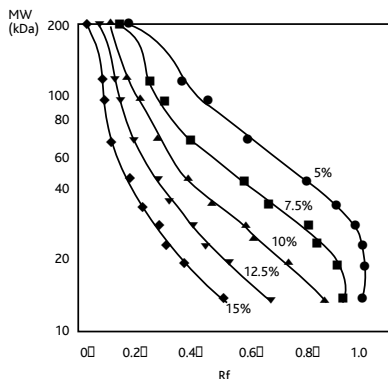


図5. 標準タンパク質の移動度とポリアクリルアミド濃度の関係

タンパク質マーカーを5種類の濃度のポリアクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行ない、結果をプロットしました。

蛍光検出を行う場合の注意点

アクリルアミドゲルはアガロースゲルと異なり、ゲル自体の蛍光によりバックグラウンドが上昇することはほとんどありません。ただし、ゲル自体が薄く取り扱いがしにくいことから、ガラスまたはプラスチックで支持されている場合がほとんどです。この場合、ガラス板やプラスチック

板の蛍光によるバックグラウンドの上昇が生じます。

蛍光検出ではプラスチック板により支持されているプレキャストゲルの使用も可能ですが、プラスチック板はガラス板に比べて蛍光が一般的に高いようです。したがって、感度を要求する実験系の場合は、電気泳動ゲルの支持体としてガラス板を用いることをおすすめします。

弊社では低蛍光ガラス板を使用することをおすすめしています。一般的な電気泳動ゲル支持用の青板ガラスの場合は、ガラス自体が蛍光を有するうえ、ガラスの蛍光量が均一でない場合が多く認められます。また、ガラス自体の汚れにより、画像がきれいに取れない場合もあります。

最近販売されている共焦点方式の蛍光スキャナーの場合は、焦点面以外のシグナルの取込み率は低くなるので、比較的蛍光のバックグラウンドの上昇を抑えることができます。

また、ガラス板に挟んだまま、ゲルのスキャンをすることも可能です。ただし、タンパク質の蛍光検出の場合は、ガラス板の汚れにより感度の低下が起きることがあります。

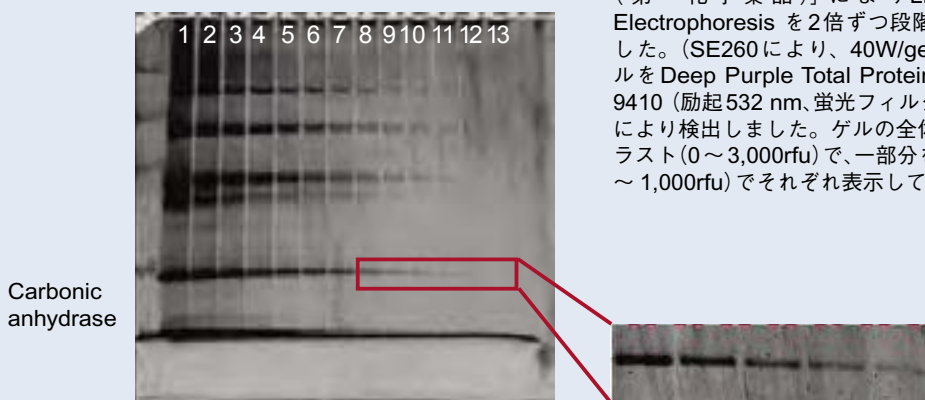
図6に検出例を示します。

※使用するバッファーやマーカーに関しては9月発信分 milestone 『蛍光検出基礎知識 検出の達人への道① アガロースゲル電気泳動』と同様になりますのでご参照ください。

実験例

図6. 二次元DS-PAGEゲルのSYPRO Ruby染色

12.5%アクリルアミドゲル[PAGミニ「第一」12.5 (13W) (第一化学薬品)]によりLMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis を2倍ずつ段階希釈したものを電気泳動しました。(SE260により、40W/gelで約1時間)電気泳動後のゲルをDeep Purple Total Protein stain 試薬で染色しTyphoon 9410 (励起532 nm、蛍光フィルター 560LP PMT電圧500 V)により検出しました。ゲルの全体図を比較的なだらかなコントラスト(0~3,000rfu)で、一部分をコントラストを強調して(200~1,000rfu)でそれぞれ表示しています。



GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073

東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL : 03-5331-9336 FAX : 03-5331-9370

e-mail : Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。