

## 07 本泳動 蛋白質の分離

### ◀ 0D 泳動 ▶

0次元泳動は1次元泳動に懸ける試料蛋白質をゲル中に泳動濃縮させるために行われるが、この濃縮の成否が結果に大きく影響する。この0次元泳動で濃縮しないサンプルは脱塩が不十分な場合が多い。

#### 手順1

上部バッファー (2D 10x EL buffer 10 ml, L-cysteineHClH<sub>2</sub>O 3.5 g, 10M urea 50 ml / final100 ml) と下部バッファー (0D 50x gel buffer 2 ml / final100 ml) を作成する。

#### 手順2

0D ゲル上に残っているプレランバッファーを十分に除去する。普通、流しでゲルコンテナを振って落としてから、逆さにして、ティッシュでいねいに拭う。

#### 手順3

下部バッファー槽にバッファーを入れ、ゲルコンテナを立てる。

#### 手順4

用意した蛋白水溶液をピペットマンでゲル上に載せる。上部バッファーをピペットマンかパスツールピペットで蛋白水溶液の上にゆっくり載せていく。この操作はとくに慎重に行い、蛋白水溶液の上面を乱さないように十分注意する。残りのバッファーを上部バッファー槽に入れる。

#### 手順5

100 V CV で通電開始。色素が濃縮され、鋭いバンドになってゲル中に泳動していく。ゲルの上端から5 mm程度泳動したら通電を止める。これに要する時間は普通5分程度だが、サンプルによってより長くなる場合がある。

#### 手順6

上部バッファーを捨て、ゲルコンテナの下からシリンジでゲルと器壁の間に水を注入してゲルを剥離させる。たいていの場合左右両側面に注入するとゲルが外れる。

#### 手順7

下敷きの上にポリシート (ポリ袋でもよい) を敷いておき、その上に4本のゲルを順に並べる。色素のバンドが完全に収容されるように、カッターで色素のバンドの下でゲルを切ると、10 mm 未満の sample gel ができる。

## ◀ 1D 泳動 ▶

プレランが終わった1次元ゲルは全長が pH 8.6 になっている。蛋白分子は pH 8.6 におけるネットチャージを駆動力にして等速に泳動し、それぞれの泳動速度の違いで分離していく。7% acrylamide なのでゲルの分子篩効果は小さい。

### 手順1

プレランの場合とまったく同じ組成の1次元バッファーを作成する。

### 手順2

2個のWクリップをはずし、sample gel window を開くと、1次元ゲルが 15 mm 程露出する。sample gel を色素のバンドが下になるように、露出した1次元ゲルに沿わせて置き、sample gel の長さに合わせて1次元ゲルをカッタースパークで切除する。sample gel よりごくわずかに長く切除するのがコツ。切除してできたスペースに、APSを加えない1D gel solution を少量滴下した後 sample gel を嵌める。このとき気泡を残さないように慎重に、1次元ゲルと sample gel とを密着させる。APSを加えてゲル化できるようにした1D gel solution を、4個の sample gel を覆うように加える。sample gel window を閉じ、片手でしっかり押さえながらもう一方の手でWクリップを止める。このときゲルの狭間に気泡を残さないよう注意する。

### 手順3

そのゲル化が終わったらゲルコンテナを下部バッファー槽に立て、上下のバッファー槽にバッファーを加える。下部バッファー槽にふたをし、ゲルコンテナの背後からファンで風冷する。

### 手順4

170 V CV で通電開始。acridine orange (AO)のバンドが下方（マイナス極方向）に向かって泳動していく。これを追って塩基性蛋白が下方へ、中性～酸性蛋白は逆に上方へ泳動していく。もちろんこれは見えない。通電時間は通常10時間くらいだが、分析しようとする蛋白質が全てゲル上にとどまり、かつできるだけゲル画面を大きく使えるように適正に設定する。目安として大腸菌の最も速い塩基性蛋白（リボソーム蛋白 L34）は AO の 70%位の速度で泳動する。また最も速い酸性蛋白の泳動速度は L34 の 50%位である。

### 手順5

通電が終わるとゲルコンテナから上部バッファー槽を外し、次いでゲルコンテナのカバーを外す。1次元ゲルの sample gel より下の塩基性部分は 10.5 cm、上の酸性部分は 5.5 cm を採用し、両端の余剰部分はカッタースパークで切除する。2D 泳動の前に、右から 10.5 cm、sample gel、5.5 cm の順に2次元ゲル上に横たえる。

## ◀ 2D 泳動 ▶

プレランが終わった2次元ゲルは全長が pH 3.6 になっている。蛋白分子は pH 3.6 におけるネットチャージを駆動力にして泳動するが、16% acrylamide による分子篩効果とネットチャージが泳動速度を決定する。

### 手順1

上部バッファー (2D 10x EL buffer 40 ml, L-cysteineHClH<sub>2</sub>O 14 g, 10M urea 280 ml / final 400 ml) と下部バッファー (2D 10x EL buffer 40 ml, concHCl 1 ml / final 400 ml) を作成する。

### 手順2

プレランバッファーを捨てた後、L型スパーテルで2次元ゲルの両端に残る余剰のゲルを切除しておく。スパーテルを使って他の部分の掃除をする。

### 手順2

2次元ゲルの上には1次元ゲルを横たえるための高さ5mmのスペースがある。ここにAPSを加えたContacting gel solutionを少量滴下した後、両手に2本のスパーテルを操って、用意した1次元ゲルを右から10.5cm、sample gel、5.5cmの順で横たえていく。1、2次元ゲルの間に気泡を残さないよう注意する。Contacting gel solutionのゲル化との競争になるから、加えるAPSの量を適正にする。これを4回繰り返す。ゲル化すると1、2次元ゲルは柔らかく接着される。

### 手順3

接着が終わると、上部バッファー槽の手前側と奥側の両方から静かに上部バッファーを注ぎ、1次元ゲルが濡れる程度のところで一時止める。1枚のナイロンネットが4本の1次元ゲルに覆い被さるように広げる。ゲルとゲルの間に溝が5本設けられているから、この溝にwedgeをしっかり嵌めていく。こうして1次元ゲルは強く張られたナイロンネットによって2次元ゲルに強く圧着される。残りの上部バッファーを加える。次いで下部バッファーを注ぐ。

### 手順4

下部バッファー槽のゲルコンテナが座っている部分以外の空いた部分を細長いふたで覆う。はたがねの下に差し込めばよい。上部バッファー槽にもふたをする。風であふられないように重石を置く。ファンで4枚の2次元ゲルの間の隙間に送風する。この送風を怠るとジュール熱で2次元ゲルに亀裂が生ずる。

### 手順5

100 V CV で通電する。通電時間はそれぞれの目的に応じて適正に設定する。フロントマーカのpyronineYがゲル下端を通過し終わった時点で終了すれば、どんな蛋白質もゲル

上に収容できる。スポットパターンを2次元方向に拡大したいときは時間を延長すればよい。

#### 手順6

通電が終わると、流しに装置を移す。バッファを捨て、装置を解いていく。まずラジオペンチを使って wedge をはずす。ナイロンネットもはずれる。次いで上部バッファ槽をはずす。さらにはたがねを解くと、ゲルコンテナだけになる。強く接着しているゲルコンテナからゲルを剥離させるために、1次元ゲルの端に浅くスパーテルを差し込み、こじる。これを4枚繰り返す。次に1枚目のゲルコンテナを外し、2次元ゲルの左右どちらかの端に水道水を弱く垂らしながら2枚目のゲルコンテナとゲルの間にスパーテルを差し込み、慎重にその橋からゲルを剥離させていく。外れたゲルを手袋した片手で持ち、染色液のバットに沈める。同様に他の3枚のゲルもプラスチック網を間にはさみながら染色液に移す。