

## 02 蛋白質試料の調製

現在 RFHR 法で最もよく適用される蛋白質調製法は酢酸法 (Hardy, S.J.S. et al. (1969) *Biochemistry* 8, 2897-2905) である。試料水溶液に 1/10 容の 1M MgCl<sub>2</sub> を加え、十分に攪拌しつつ 2 倍容の酢酸を加えていく。その後氷冷しながら 1 時間攪拌を続ける。蛋白質は溶解し、核酸は不溶化する。6000 rpm 20 min 4°C 遠心し、その上澄液を 2% 酢酸に 4°C 透析する。透析外液を数回更新する。この操作で十分に脱塩することが極めて重要である。脱塩が不十分な場合、0 次元泳動での蛋白質の濃縮に失敗することが多い。不溶性の試料から調製する場合、67% 酢酸 30 mM MgCl<sub>2</sub> に懸濁し、その後氷冷しながら 1 時間攪拌し、以下同様に操作する。透析後凍結乾燥によって得られた乾燥粉末を -80°C に保存する。他の蛋白質調製法も適用できるが、いずれの場合も十分に脱塩することが必須である。

## 03 蛋白水溶液の作成

普通 8M urea に溶かし、2~1 mg/100 $\mu$ l の水溶液にする。2-mercaptoethanol (ME) を 14  $\mu$ l / ml の濃度に加え、37°C 1hr または 40°C 30 min 還元する。その後 50x sample buffer を 1/50 容加えると出来上がり。

この溶液状態でも短期間 -80°C 保存できるが、なるべく電気泳動操作の都度、粉末から調製した方がよい。ゲルに添加する蛋白適量は、例えば大腸菌のリボソーム蛋白の場合は 100~300  $\mu$ g/gel 程度、リボソームを除いた全可溶性蛋白の場合は 500  $\mu$ g/gel 程度であり、蛋白濃度は 1~2 mg/100  $\mu$ l が適当である。

## 04 STOCK SOLUTIONS

### 1. 0D 50x buffer (at RT = room temperature)

5N KOH 24 ml, Acetic acid 7.4 ml / final 200 ml

### 2. 50x sample buffer (at 4°C)

Acridine orange 4 mg, Pyronine Y 4 mg を 0D 50x buffer 1 ml に溶かす。

### 3. 1D 4x buffer (at RT)

Tris 195 g, boric acid 128 g, EDTA2Na 32 g / final 1L

4. 2D 10x gel buffer (at RT)  
5N KOH 96 ml, acetic acid 523 ml / final 1L
  
5. 2D 10x EL buffer (at RT)  
glycine 150 g, acetic acid 16 ml / final 1L
  
6. 10M urea (at RT or 30°C)  
urea 600 g / final 1L
  
7. 0D gel solution (at 4°C)  
AA 14 g, BIS 250 mg, urea 84 g, TEMED 0.6 ml,  
0D 50x buffer 4 ml / final 200 ml
  
8. 1D gel solution (at 4°C)  
AA 14 g, BIS 250 mg, Urea 84 g, TEMED 0.6 ml,  
1D 4x buffer 50 ml / final 200 ml
  
9. contacting gel solution (at RT)  
pyronineY 40 mg を 1D gel solution 10 ml に溶かす。
  
10. 2D gel solution (at 4°C)  
AA 170 g, BIS 4.7 g, urea 420 g, TEMED 5.8 ml,  
2D 10 x buffer 100 ml / final 1L
  
11. paste gel solution (at RT)  
AA 50 g, BIS 1.4 g, TEMED 1.2 ml / final 200 ml
  
12. 10% APS (at RT)  
APS 5 g / final 50 ml