



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                  |                                                                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | SDS-PAGE                                                                          |
| Author(s)        | 井上, 名津子; 菓子野, 康浩                                                                  |
| Description      | 3章 単離・精製・活性測定 6. タンパク質 a                                                          |
| Relation         | 光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編                                                  |
| Citation         | 低温科学, 67, 359-371                                                                 |
| Issue Date       | 2009-03-31                                                                        |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/39167">https://hdl.handle.net/2115/39167</a> |
| Type             | departmental bulletin paper                                                       |
| File Information | 67-052.pdf                                                                        |



## 6. タンパク質

### a. SDS-PAGE

井上 (菓子野) 名津子<sup>1)</sup>, 菓子野康浩<sup>2)</sup>

調製した生体試料のタンパク質組成を解析する際などに、最初に行われる最も基礎的な実験のひとつが SDS-PAGE であろう。近年のプロテオミクス解析に於いて広く用いられる等電点二次元電気泳動でも、二次元目には SDS-PAGE が行われるのが一般的である。比較的容易に行うことができる SDS-PAGE であるが、手元の生体試料に含まれているタンパク質群の中にある重要なタンパク質を見落とさないために留意しておくといふことがある。本稿では、4 種類の SDS-PAGE 系を比較しながら、それぞれの実験方法を簡単に記述する。

## SDS-PAGE

Natsuko Inoue-Kashino, Yasuhiro Kashino

SDS-PAGE is one of the very basic techniques for the protein analysis. One has to keep in mind the availability and the limit of this technique. In this section, we will describe the characteristics of four SDS-PAGE systems and present the outline of the procedure.

### 6.a.1 各種の SDS-PAGE 系

SDS-PAGE は、精製した標品などのタンパク質組成を解析するために頻繁に用いられる基本的な分析法の一つである。SDS-PAGE でタンパク質を分離し、その後ウェスタンブロットによるタンパク質の同定、また、N 末端配列解析や MS 分析を行うことも日常的に行われる。しかし、SDS-PAGE とひとくちに言っても、いろいろな系が開発されてきており、それぞれに特徴がある。それぞれの特徴をつかんで、自分の研究対象のタンパク質を分離できる系を選ぶことが重要である。また、解析対象の標品に含まれているタンパク質を捉えるためには、ひとつの系にこだわらず、別の系で、あるいはゲル条件を変えて泳動してみることも必要であろう。そのために見たくないものも見えてきてしまうこともあるかもしれないが、誤った結論に行き着かないためには、いま使っている系ではもしかしたら見えていないだけのタンパク質が含まれている可能性もあることも心しておくべきである。またごく少数の例外とも言えるかも知れないが、電気泳動後の染色で染色されづらいために、実際には存在するのに検出が困難な Ninja タンパク質<sup>3)</sup> ともいえるタンパク質がある。たとえば、リジン、ヒスチジン、システインを全く含まない PsbW は Coomassie による染

色性がかなり低い<sup>1)</sup>。PsbJ も染色性が低く、検出することが困難な場合が多い<sup>2)</sup>。また、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の Psb30 も染色性が低く、また、抗体を使っても検出が困難な場合もある<sup>3)</sup>。pI が泳動バッファの pH よりも大きいと、泳動されないことにもなる。

本稿では、我々の研究室で日常的に用いている 4 つの系の手順を紹介する。第一は、Mes/Tris の系である<sup>10)</sup>。我々は、日常的には 18-24% アクリルアミド、6 M 尿素のスラブゲルを作成し、用いている。この条件で、3 kDa 程度から 100 kDa 超まで、膜タンパク質の多くを明瞭に分離することが可能である。場合により、均一アクリルアミド濃度のゲルや、ミニゲルも作成し、用いている<sup>5,6)</sup>。この系は、次に述べる 3 M Tris の系の不自由な点を解消するために、3 M Tris の系を元に開発したものである。3 M Tris の系に比べると尿素濃度が低いいためか低分子量域で若干シャープさに欠けるバンドもあるが、20~50 kDa 域ではより明瞭なバンドが得られることが多い。また、*Synechocystis* sp. PCC 6803 の D1/D2 タンパク質は明瞭に別個のバンドとして分離されるが<sup>4)5)</sup>、6 M 尿素のゲルでは *Thermosynechococcus elongatus* の D1/D2 タンパク質は分離されず単一のバンドとなる。この Mes/Tris の系では、通常 6 M 尿素のゲルで十分な分離が得られるため、冬季室温がかなり下がってしまう研究室でも問題なく使用することができる。また、分離ゲル緩衝液は Tris, Mes, SDS を溶解させるだけで pH 調整の必要がないため、緩衝液調製が容易であり、また、

1) 岡山大学大学院自然科学研究科

2) 兵庫県立大学大学院生命理学研究科

緩衝液調製ごとの再現性も充分である。冬季に室温がかなり下がってしまう研究室に於いても、ストック溶液が析出することはない。

第二の系は、池内により開発された 3 M Tris の系である<sup>7)</sup>。通常使われる 16-24% アクリルアミド、7.5 M 尿素のゲルにより、3 kDa 程度から 100 kDa 超まで、膜タンパク質の多くを非常に明瞭に分離することが可能である。このゲル条件では、*Thermosynechococcus elongatus* の D1/D2 タンパク質も明瞭な別個のバンドとして分離される。ゲルに含まれる尿素濃度が高いため、冬季に温度が低い研究室に於いては、泳動中に尿素が析出することもあり、また、そのような環境では、分離ゲル緩衝液やアクリルアミドのストック溶液も析出することもあるので、注意が必要である。

第三の系は、Schägger らにより開発された Tris/Tricine の系である<sup>8)</sup>。1 kDa から 100 kDa 程度までを分離できる系である。低分子量域の分離にとくに優れている。ただし、膜画分や膜タンパク質複合体の解析の際は、やはり脂質除去処理 (6.a.3.1) を行わないと十分な分離が得られないのは、上記の系と同様である。一方、40 kDa 程度以上になるとバンドの間隔が非常に狭くなり、高分子量域の解析には困難が伴うことが多いようである。この系での電気泳動は、上記ふたつの系や Laemmli の系に比べてコスト高になり、また同じゲルサイズでも長い泳動時間が必要であるが、アクリルアミドの濃度勾配を作成する必要がなく、また、ゲルに尿素を含まないので、ゲル作成が容易である。ただし、6 M 尿素を含むゲルも用いられることもある<sup>9)</sup>。

第四の系は、Laemmli により報告された系で、最も一般的に使われている。ゲルに尿素が含まれていれば膜タンパク質の分離も申し分ない。また、アクリルアミドの濃度勾配ゲルを作成することにより、分離可能な分子量域も広げることができる。必要な泳動時間も上記 3 種類の系に比べて短い。ただし、アクリルアミド濃度を上げても、低分子量のタンパク質を明瞭なバンドとして分離することは困難である。10 kDa 程度以上のタンパク質を対象とする場合には、この系が便利であろう。

上記のように、それぞれ特徴があるが、系によりタンパク質の移動度が異なり、また、移動度の逆転が起こる場合もある。これを利用して、一次元目と二次元目のゲルの系を変えて二次元電気泳動を行い、分子量が似ているために分離しにくいタンパク質相互を分離することも可能な場合がある。

このように、SDS-PAGE にもいろいろな系があるが、系は違っても、基本的な原理は共通である。タンパク質

は多価電解質であり、電場中に置かれると電荷に依存した速度で陽または陰極に移動するので電荷の異なるタンパク質を分離することができる。この際、支持体としてアクリルアミド重合体のゲルを用いるのが PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) である。ポリアクリルアミドゲルは電気泳動の際の良い支持体であり、大きさにより分子を分離する分子篩効果を持つ。界面活性剤 SDS (Sodium Dodecyl (または Lauryl) Sulfate) が結合してタンパク質を変性させると、SDS の硫酸基によってタンパク質は負に荷電する。この時結合する SDS 量はタンパク質の種類に依らず単位重量当りほぼ一定である。このため、SDS が結合したタンパク質は電場中で陽極に移動し、ポリアクリルアミドゲル中では分子篩効果のために大きな分子ほど移動度が小さく、小さい分子ほど移動度が大きくなる。これにより、ポリペプチドの鎖長 (分子量) で移動度が決まる。SDS-PAGE では、このようにしてタンパク質が分離され、ポリペプチドの移動距離 (移動度) から分子量を推定することが可能である。分子量標準試料の移動距離を横軸に、分子量の対数を縦軸にしてプロットして分子量標準曲線を作成する<sup>10)</sup>。目的のタンパク質バンドの移動距離を測り、分子量標準曲線から「見かけの」分子量を得ることができる。この「見かけの」分子量は、厳密な意味での分子量ではない。個々のタンパク質の性質も反映され、移動距離は標準曲線から若干ずれることもある。いっぽんに、同じ分子量のタンパク質であっても、膜タンパク質の移動距離は水溶性タンパク質の移動距離よりも大きくなる。

本稿の読者は光合成に関わるタンパク質を研究対象にしている、そして多くの場合、チラコイド膜など、膜画分のタンパク質の分離が往々にして重要になると考えられる。膜タンパク質を SDS-PAGE で分離する場合、尿素を含むゲルを使用した方がいっぽんにバンドが明瞭である。水溶性タンパク質の場合、尿素が含まれていなくても明瞭なバンドとなることが期待できるが、膜タンパク質の場合は、4~7 M 程度の尿素が含まれている方が分離およびバンドの明瞭度がよい。もちろん、水溶性タンパク質もより明瞭なバンドとして得られる。ただし、本稿で取り上げる Tris/Tricine の系では尿素を含まなくても、膜タンパク質が明瞭なバンドとして得られる。尿素がタンパク質の分離に与える影響は、文献<sup>5)</sup>で取り上げてある。また、アクリルアミド密度勾配のゲルの方が、均一アクリルアミドゲルよりも、しばしばバンドが明瞭になる (図 1)。

これらのことは、レディメイドゲルではなく、実験ごとにゲルを自分で作らないといけないことを意味する。

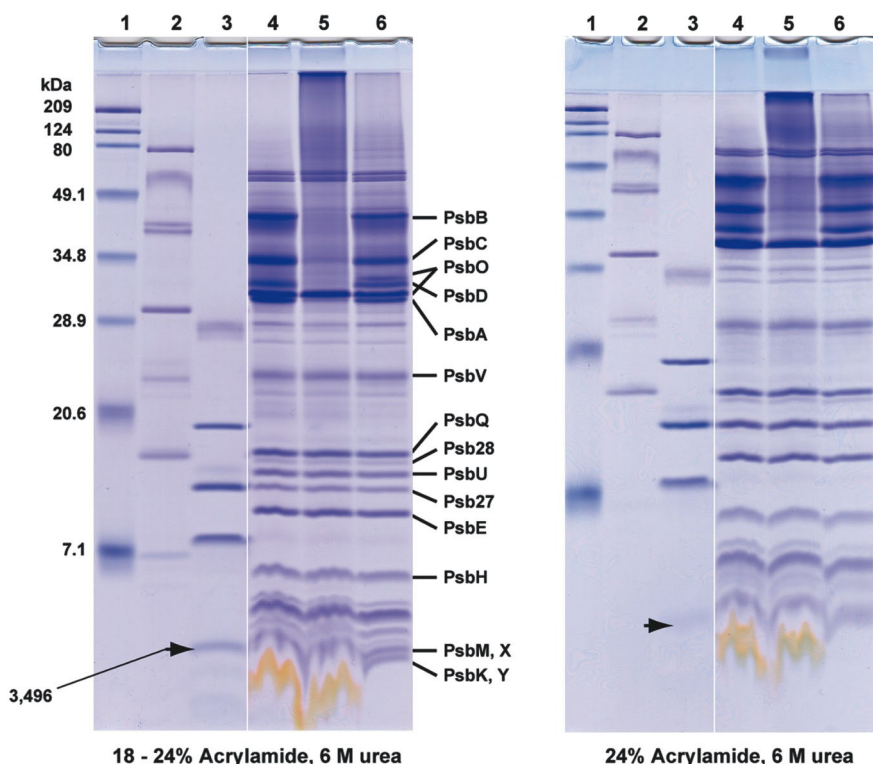


図 1：サンプル処理の効果。

*Synechocystis* sp. PCC 6803 HT3 株から精製した光化学系II複合体を使い、変性液を加えただけの場合 (Lane 4)、変性液を加えた後 95°C で 5 分間の熱処理を行った場合 (Lane 5)、脂質除去処理を行った場合 (Lane 6) を比較した。いずれも 5  $\mu$ g Chl 相当量の光化学系II複合体を泳動した。ゲルは、Mes/Tris 系の 18-24% アクリルアミド濃度勾配ゲルで 6 M 尿素を含む。

Lane 1~3 は、分子量マーカーである。

Lane 1, Bio-Rad 161-0317; Lane 2, Bio-Rad 161-0304; Lane 3, Bio-Rad 161-0326

Lane 3 の 161-0326 には、以下のタンパク質が含まれている。

- 26,625 Triosephosphate isomerase
- 16,950 Myoglobin
- 14,437  $\alpha$ -Lactalbumin
- 6,512 Aprotinin
- 3,496 Insulin b chain, oxidized
- 1,423 Bacitracin

尿素を含むゲルは日持ちしないので (尿素の変性と析出のため)、せいぜい 2, 3 日程度の保存であろう。もし保存する場合は、ゲル板上部をラップで丁寧に包み、水分が蒸発しないようにしておく。尿素濃度が 7.5 M のゲルでは、低温では尿素が析出するので、冷蔵庫での保存は禁物である。

## 【実験方法】

### 6.a.2 アクリルアミド濃度勾配ゲルの作成

図 2 に示すようにガラス板、ペリスタポンプ、ミキシング管をセットする。ミキシング管の下にスターラを置き、ミキシング管のペリスタポンプに近い側に回転子を入れる。我々は、10 mm 長の三角柱状回転子を使っている。回転子の体積を考慮すると、ミキシング管のペリス

タポンプとは離れた側 (図 2 では右側) の底面にコインを 1 枚敷くと、二つの管に液を入れたときに液面がほぼ同じ高さになる。ペリスタポンプのプレッシャーノブを回し、適度な強度で送液チューブを締め付ける。ミキシ

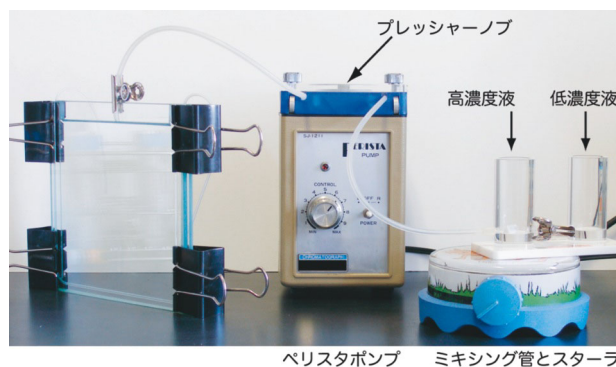


図 2：アクリルアミド濃度勾配ゲルの作製。

ング管の二つの間を繋ぐチューブを目玉クリップで閉じる。目玉クリップの方が、スクリューコックよりも使い勝手が良いようである。

1. まず低濃度アクリルアミド溶液に過硫酸アンモニウム液を加えて攪拌し、次いで TEMED を加えて攪拌する。この溶液を、ミキシング管のペリスタポンプとは離れた側（図2では右側）に入れる。
2. ミキシング管の二つの管を繋ぐチューブを閉じた目玉クリップを少し開き、このチューブ内の空気を押し出し、また目玉クリップを閉じる。
3. 高濃度アクリルアミド溶液に、1と同様にして過硫酸アンモニウム液と TEMED を加え、ミキシング管のペリスタポンプに近い側（図2では左側）に入れる。このとき、プレッシャーノブを閉め忘れていると液が送液チューブに流れ込んでしまう。その場合は、慌てずにプレッシャーノブを締め、ミキシング管の方に液を送り返す。
4. 用意ができれば、スターラを適度な速さで回転させ、ペリスタポンプのスイッチを入れ、ミキシング管につけた目玉クリップをはずす。この際、低濃度アクリルアミド溶液が高濃度アクリルアミド溶液の中に流れ込んでくるか、確認する。流れ込んでくると、シュリーレンが観察される。流れ込んでくるのに若干のラグがあることもあるが、それはとくに問題ではないことが多い。スターラによっては、目玉クリップを外さないと回転子がうまく回転しないことがある。また、残液量が少なくなるに連れて、スターラを速度を徐々に落としていくと良い。送液速度は、スラブゲルの場合(10 mL+10 mL)、10分近くの時間をかけるのが良いようである。
5. ゲル液がすべてゲル板に注がれたら、あるいは所定の高さまで注がれたら、ペリスタポンプを止め、送液チューブをゲル板から外す。ゲル板の中のゲル液上面に、パスツールピペットを使って静かに純水を重層する。これは、ゲル液を空気（酸素）から遮断するためである。この際、ガラス板にゲル液が辿った痕がついているので、そこから注ぎ込むとゲル液の上面を乱さずに純水を重層することができる。一カ所から注ぐだけで、純水は左右に広がっていく。純水を注ぐのが苦手であれば、水を飽和させたイソブタノールを使うと、容易になる。しかし、この場合、余計な有機廃液が発生することになる。
6. 過硫酸アンモニウム液と TEMED は、1時間ほどでゲル化が完了する程度が良いようである。重層した純水とゲル液との境界が次第に不明瞭になるが、ゲル化

が完了すると、重層した純水の下部が再び明瞭になる。また、ゲル底部とスぺーサとの間にも明瞭な線が見られる。

7. 分離ゲルができれば、濃縮ゲルを作成する。濃縮ゲルアクリルアミド溶液に過硫酸アンモニウム液を加えて攪拌し、次いで TEMED を加えて攪拌する。分離ゲルの上部の液体をアクリルアミド廃液入れに回収し、少量の上記濃縮ゲル液で共洗いする。共洗いを行わないと、分離ゲルと濃縮ゲルの境界に波状のシュリーレンが見えるゲルができる。共洗い後、濃縮ゲル液を適量注ぎ、サンプルコームを差し込む。この際、気泡が残らないように注意する。サンプルコームを水平に差し込むよりも、サンプルコームを傾けて片方を先に差し込み、その後徐々に水平になるように差し込んでいくと、気泡が押し出されていき、気泡が残りにくい。ミキシング管は、スラブゲルを作る際は、内径 24 mm、高さ 55 mm の管のものを使っている。どこの電気泳動メーカーでも作成してくれるであろうが、我々は日本エイドーに依頼している。

サンプルコームは、必要に応じ、ウェルの数を変えたものを作成している。N末端配列解析の際や、抗原調製のためにタンパク質バンドを大量に回収したい場合、二次元電気泳動のための幅広のウェルが必要な場合など、12連などのウェルがついたサンプルコームよりも、カーテン状の泳動を行った方がいいことがある。このような場合にも、サンプルコームを自作している。サンプルコーム用のテフロン板も、どこの電気泳動メーカーからも可能であろうが、我々は日本エイドーから調達している。

### 6.a.3 サンプル処理

膜タンパク質を多く含む標品の場合、また、膜タンパク質をターゲットとした解析の場合、サンプル処理が重要である。多くの電気泳動の教科書には、熱処理を行うように記載されている。しかし、図1に示したように、変成処理液を加えた光化学系II複合体を90度で5分間熱処理すると、D1/D2タンパク質、CP43/CP47タンパク質の多くは凝集してしまっており分離されなくなってしまう。多くの水溶性タンパク質は熱処理をしなくても充分に変性されるため、熱処理は必要ない。したがって、通常は、熱処理は行うべきではない。ただし、超好熱菌のLHCのように、熱処理などを行わないと変性されず、クロロフィル複合体のまま泳動された例もある。もっとも、我々の経験では、脂質除去処理によりそのLHCも充分に変性させることができた。

### 6.a.3.1 脂質除去

低分子量タンパク質を解析する場合は、脂質除去処理を行う必要がある。これは、図1に示したように、多量に含まれる脂質とクロロフィルが低分子量タンパク質の分離を妨げるからである。脂質除去処理を行うことにより、低分子量域の分離が劇的に改善される。ただし、D1/D2 タンパク質など、比較的分子量の大きな膜タンパク質が凝集し、分離ゲルに展開される量が減ってしまうものがある。

我々は、通常ジエチルエーテルを使って脂質除去を行っている。クロロフィル定量、あるいはタンパク質定量を行い、標品の泳動に必要な量を定める。処理量が30  $\mu$ Lを超える場合は、複数に分け、脂質除去処理終了後ひとつに合わせるようにする。これは、30  $\mu$ L 以上の水溶液ではジエチルエーテルと混和しないためである。30  $\mu$ L 以下の標品に100  $\mu$ L のメタノールを加え、ボルテックスにより攪拌する。そして、1 mL のジエチルエーテルを加え、攪拌し、10,000 rpm で10分間、遠心する。ドラフト中で、パストールピペットを使って上清を静かに取り除く。上清を除いたら、なるべく速やかに変性液を加え、バスタイプの超音波破碎器・ボルテックスを使って沈殿を溶解させる。乾燥してしまうと、変性液に溶解しづらくなることがままある。バスタイプの超音波破碎器で沈殿を溶解させる際は、キャビテーションポイントにサンプルチューブを配置するように注意する。どうしても沈殿が残る場合、サンプルチューブのふたを開けて氷上に静置し、少量残存しているジエチルエーテルを蒸発させると改善されることがある。この脂質除去処理は、エッペンドルフタイプのサンプルチューブで問題なく行うことができる。

### 6.a.3.2 タンパク質濃度が低い場合のサンプル処理

ゲル濾過後の標品を泳動する場合など、タンパク質濃度が低く、そのまま泳動サンプルとして調製することが困難な場合がある。泳動に必要な標品量が1 mL 以下の場合、エッペンドルフタイプのサンプルチューブに標品を入れ、最終体積を1 mL になるように純水を加える。83  $\mu$ L の98% TCA を加え、十分に攪拌し、10,000 rpm で15分間、遠心する。上清を捨て、変性液を加える。必要標品量が1 mL 以上の場合、ファルコンチューブを使って同様に処理すると良い。必要があれば、脂質除去処理を行う。この際、変性液を加える前に上記のようにメタノールとジエチルエーテルを加えて、処理を行う。この脂質除去のために溶媒に沈殿を溶解させる際、バスタイプの超音波破碎器を使うと良いが、破裂する恐れがあるので十分な注意が必要である。ただし、TCA 処理だけで

脂質がある程度除去されるようで、改めて脂質除去処理を行う必要性は低い場合が多い。TCA が皮膚などに触れるとやけどを負うので、取り扱いには十分な注意が必要である。

### 6.a.3.3 サンプル量

標品の必要量を計算し、通常は、変性液と標品を等量ずつ混合し、泳動サンプルとする。目的、サンプルの状況によっては、上記のようにTCAによる濃縮や脂質除去のステップが必要になる。泳動サンプルは、スラブゲルの12連のコームの場合1ウェルあたり10  $\mu$ L が適量である。そして、光化学系I、II標品やチラコイド膜では1ウェルあたり5  $\mu$ g Chlが良いようである。その他の標品の場合、経験あるいは文献に当たるのが良いが、例えば、BSAをスラブゲルで泳動した場合、10  $\mu$ g 程度がCoomassie Blueで染色される充分なバンドになることがサンプル量を考慮する参考になるであろう。また、1ウェル分だけを処理するのはいろいろなステップでの作業がやりづらいので、標品に余裕があれば2～3ウェル分程度を調製するとよい。例えば、1,400  $\mu$ g Chl/mLの標品の場合、10.7  $\mu$ L (5  $\mu$ g chl  $\times$  3ウェル分, 15  $\mu$ g Chl)をサンプルチューブに分注し、標品懸濁液を15  $\mu$ L になるように加え、変性液を15  $\mu$ L 加えて(最終体積30  $\mu$ L)、10  $\mu$ L を泳動する。TCA 処理や脂質除去処理を行った場合、30  $\mu$ L の変性液を加え、10  $\mu$ L をロードする。

### 6.a.3.4 変性液の組成

我々の用いている変性液(ローディング液)は、40 mM DTT, 5.2% LDS, 172 mM Tris, 0.5 M sucrose, 0.01% pyronin Y, である。変性液を加えた泳動サンプルは、ローディングの時まで氷上に置いておく。高濃度のSDSは低温で析出しやすく、LDS(Lithium Dodecyl Sulfate)の方が低温での溶解度が高いので、LDSを用いている。pyronin Yは赤色の色素で、泳動の状況を確認するためのものである。Pyronin Yは現在ではSigmaから手に入れることが可能であるが、BPB(bromophenolblue)でも良い。sucroseは、泳動サンプルの密度を上げるために加えてある。尿素入りのゲルでは、サンプルをロードしている間にも尿素がウェル内の泳動バッファに溶け出してウェル内の密度が上がり、サンプルのローディングがうまく行かないことがある。このような場合、sucroseによりサンプルの密度を上げておくとうまい。グリセロールでも良い。このような変性液を適量調製し、サンプルチューブに500  $\mu$ L 程度ずつ分注して冷凍しておくとう便利である。解凍・凍結を複数回繰り返しても、分離には問題ないようである。ただし、ヘム染色を行う場合、新

鮮な DTT が必要で、解凍を繰り返した変性液は不適である。また、そのような変性液では、ヘム蛋白質(PsbV など) のバンドも不明瞭化しがちである。

### 6.a.3.5 サンプルのローディング

両端のウェルを使ったレーンでは、バンドが歪みがちである。両端のウェルを使わない場合、サンプル量の 2 割増し程度（サンプル量が 10  $\mu$ L であれば 12  $\mu$ L）の変性液をこれらのウェルに入れてから泳動すると良い。このことにより、スカート状に裾が広がるのを抑えることができる。また同様に、全部のウェルを使わない場合、サンプルをロードしたウェル達の両側にサンプル量の 2 割増し程度の変性液を入れてから泳動すると、泳動結果がスカート状に裾広がりになるのを抑えることができる。

サンプルのローディングは、先端の細いチップをつけたマイクロピペッタあるいはマイクロシリンジを使って行う。この際、チップの先端あるいはマイクロシリンジの針の先端をなるべくウェルの底近くに挿入し、静かにサンプルを吐出するようにすると良い。このようにすると、サンプルはウェルの底部でしっかりとした層になり、シャープなバンドを得やすい。溶け出してきた尿素のためにロードしづらくなった場合は、シリンジなどを使ってウェル内の溶液を吸い出すと良い。

## 6.a.4 各種の SDS-PAGE 系

### 6.a.4.1 Mes/Tris の系<sup>10)</sup>

以下のように、ストック溶液を調製する。いずれも室温で保存する。未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので、取り扱いには十分な注意が必要である。また、アクリルアミドを含む廃液は回収し、ゲル化させてから廃棄する。

表 1：Mes/Tris の系での 6 M Urea，18–24%アクリルアミドゲル溶液（スラブゲル）

|              | アクリルアミド溶液   |             |             |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
|              | 18%         | 24%         | Stacking    |
| 50% アクリルアミド  | 3.6 mL      | 4.8 mL      | —           |
| 30% アクリルアミド  | —           | —           | 1.6 mL      |
| 分離用ゲル緩衝液     | 2 mL        | 2 mL        | —           |
| 濃縮用ゲル緩衝液     | —           | —           | 1.6 mL      |
| 尿素           | 3.6 g       | 3.6 g       | 2.9 g       |
| 純水           | 1.9 mL      | 0.7 mL      | 2.8 mL      |
| (体積)         | (10 mL)     | (10 mL)     | (8 mL)      |
| 10%過硫酸アンモニウム | 12 $\mu$ L  | 8 $\mu$ L   | 40 $\mu$ L  |
| TEMED        | 4.5 $\mu$ L | 4.5 $\mu$ L | 9.0 $\mu$ L |

ストック溶液（いずれも室温保存）

分離ゲル用アクリルアミド溶液（0.5% ビス）

49.5% (w/v) アクリルアミド，

0.5% (w/v) メチレンビスアクリルアミド

濃縮ゲル用アクリルアミド溶液

29.2% (w/v) アクリルアミド，

0.8% (w/v) メチレンビスアクリルアミド

分離ゲル用緩衝液；pH の調製は行わない

0.65 M Mes，3 M Tris，0.5% (w/v) SDS

濃縮用緩衝液

0.625 M Tris-HCl(pH 6.8)，1 % (w/v) SDS

電極液（Laemmli の系と同じ。ワーキング溶液）

25 mM Tris，0.192 M Glycine，0.1% (w/v) SDS

10%過硫酸アンモニウム液は、小分けして冷凍しておくくと便利である。凍結・融解を繰り返しても、通常は差し支えない。ただし、融解後は氷上に静置する。アクリルアミド濃度勾配ゲルを作成するには、表 1 にしたがってアクリルアミドゲル溶液を調製し、先述の 6.a.2「アクリルアミド濃度勾配ゲルの作成」にしたがって、ゲルを作成する。アクリルアミドゲル溶液を脱気する必要はない。10% 過硫酸アンモニウムの量は、外気温により調節が必要な場合もある。アクリルアミド均一濃度のゲルを作成するには、表 2 を参考にゲル溶液を調製する。いずれの場合も、アクリルアミド濃度を変更するときは、分離ゲル用緩衝液および尿素の量をそのままにして、50%アクリルアミド溶液と純水の量を調節する。尿素の濃度を変更するときは、表 3 の尿素濃度と液体の関係を参考にして、調節する。

アクリルアミド均一濃度のミニゲルを作成するには、表 2 を参考にして、分離ゲル液の最終体積が 10 mL になるようにする。

表 2：Mes/Tris の系での 6 M Urea，24%均一アクリルアミドゲル溶液（スラブゲル）

|              | アクリルアミド溶液   |             |
|--------------|-------------|-------------|
|              | 24%         | Stacking    |
| 50% アクリルアミド  | 9.6 mL      | —           |
| 30% アクリルアミド  | —           | 1.6 mL      |
| 分離用ゲル緩衝液     | 4 mL        | —           |
| 濃縮用ゲル緩衝液     | —           | 1.6 mL      |
| 尿素           | 7.2 g       | 2.9 g       |
| 純水           | 1.4 mL      | 2.8 mL      |
| (体積)         | (20 mL)     | (8 mL)      |
| 10%過硫酸アンモニウム | 20 $\mu$ L  | 40 $\mu$ L  |
| TEMED        | 9.0 $\mu$ L | 9.0 $\mu$ L |

表3：一定体積の尿素含有溶液を調製する際の尿素量および液体量

|        | 尿素      | 液体       | 最終体積   |
|--------|---------|----------|--------|
| 2 M 尿素 | 12.01 g | 90.93 mL | 100 mL |
| 4 M 尿素 | 24.02 g | 82.02 mL | 100 mL |
| 6 M 尿素 | 36.04 g | 74.86 mL | 100 mL |
| 8 M 尿素 | 48.05 g | 63.97 mL | 100 mL |

アクリルアミドゲル溶液を調製する際は、アクリルアミドストック溶液、ゲル緩衝液、純水の合計量を上記の液体量として考える。

泳動は、電源にも拠るが、6 M 尿素を含むスラブゲルで、180 mA・h 程度である (12 mA 定電流で約 15 時間)。最近の電子回路型の電源装置では、低めの仕事量になるようである (約 160 mA・h)。泳動度の再現性を得るためには、いつも同じくらいの電流値で泳動するのが良い。

#### 6.a.4.2 3 M Tris の系<sup>7)</sup>

以下のように、ストック溶液を調製する。いずれも室温で保存する。未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので、取り扱いには十分な注意が必要である。また、アクリルアミドを含む廃液は回収し、ゲル化してから廃棄する。これらのストック溶液は、低温で保存すると析出する可能性が高い。冬季気温の低い部屋では注意を要する。

ストック溶液 (いずれも室温保存)

分離ゲル用アクリルアミド溶液

60% (w/v) アクリルアミド、

0.8% (w/v) メチレンビスアクリルアミド

濃縮ゲル用アクリルアミド溶液

30% (w/v) アクリルアミド、

1.6% (w/v) メチレンビスアクリルアミド

分離ゲル用緩衝液

3 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.5% (w/v) SDS

濃縮用緩衝液

1.25 M Tris-HCl (pH 6.8), 1 % (w/v) SDS

電極液 (Laemmli の系と同じ。ワーキング溶液)

25 mM Tris, 0.192 M Glycine, 0.1% (w/v) SDS

分離ゲル用緩衝液を調製する際には、十分に時間をかけて pH を調整する必要がある。塩酸を加えることにより、温度が上昇し、その状態で目的の pH に合わせても、実際に使用するときには pH がずれている可能性がある。そうすると、低分子量域に於いては期待通りの分離を得ることができない。実際に泳動を行ってみて分離状況が不十分であれば、pH の再調整を行う。

表 4 にしたがってアクリルアミドゲル溶液を調製し、先述の「アクリルアミド濃度勾配ゲルの作成」にしたがっ

表4：3 M Tris の系での 7.5 M Urea, 16–24%アクリルアミドゲル溶液 (スラブゲル)

|              | アクリルアミド溶液   |             |             |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
|              | 16%         | 22%         | Stacking    |
| 50% アクリルアミド  | 2.67 mL     | 3.67 mL     | —           |
| 30% アクリルアミド  | —           | —           | 0.8 mL      |
| 分離用ゲル緩衝液     | 2 mL        | 2 mL        | —           |
| 濃縮用ゲル緩衝液     | —           | —           | 0.8 mL      |
| 尿素           | 4.5 g       | 4.5 g       | 3.6 g       |
| 純水           | 2.1 mL      | 1.1 mL      | 2.1 mL      |
| (体積)         | (10 mL)     | (10 mL)     | (8 mL)      |
| 10%過硫酸アンモニウム | 20 $\mu$ L  | 15 $\mu$ L  | 40 $\mu$ L  |
| TEMED        | 4.5 $\mu$ L | 4.5 $\mu$ L | 9.0 $\mu$ L |

て、ゲルを作成する。アクリルアミドゲル溶液を脱気する必要はない。10% 過硫酸アンモニウムの量は、外気温により調節が必要な場合もある。

泳動は、電源にも拠るが、スラブゲルで、180 mA・h 程度である (12 mA 定電流で約 15 時間)。最近の電子回路型の電源装置では、低めの仕事量になるようである (約 160 mA・h)。泳動度の再現性を得るためには、いつも同じくらいの電流値で泳動するのが良い。

#### 6.a.4.3 Tris/Tricine の系<sup>8)</sup>

文献<sup>9)</sup> にプロトコルが改めて紹介されている。

以下のように、ストック溶液を調製する。いずれも室温で保存可能である。未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので、取り扱いには十分な注意が必要である。また、アクリルアミドを含む廃液は回収し、ゲル化してから廃棄する。

ストック溶液 (いずれも室温保存)

AB-3 Mix

49.5% T, 3% C

48% (w/v) アクリルアミド、

1.5% (w/v) メチレンビスアクリルアミド

AB-6 Mix

49.5% T, 6% C

46.5% (w/v) アクリルアミド、

3.0% メチレンビスアクリルアミド

ゲル緩衝液 (3 x)

3 M Tris-HCl (pH 8.45), 0.3% (w/v) SDS

陽極液 (Anode buffer, 10)

0.2 M Tris-HCl (pH 8.9)

陰極液 (Cathode buffer)

0.1 M Tris, 0.1 M Tricine, 0.1% (w/v) SDS

表 5 にしたがってアクリルアミドゲル溶液を調製す

表5：Tris/Tricine の系でのアクリルアミドゲル溶液の調製（スラブゲル）

|              | 分離ゲル<br>(16.5%T, 6%C) | スぺーサゲル<br>(10%T, 3%C) | 濃縮ゲル<br>(4%T, 3%C) |
|--------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| AB-3 Mix     | —                     | 1.22 mL               | 0.40 mL            |
| AB-6 Mix     | 6.68 mL               | —                     | —                  |
| ゲル緩衝液        | 6.68 mL               | 2.0 mL                | 1.24 mL            |
| グリセロール       | 2.68 g                | —                     | —                  |
| 純水           | 4.5 mL                | 2.78 mL               | 3.36 mL            |
| (総量)         | (20 mL)               | (6.0 mL)              | (5.0 mL)           |
| 10%過硫酸アンモニウム | 66.8 $\mu$ L          | 24 $\mu$ L            | 40 $\mu$ L         |
| TEMED        | 7.5 $\mu$ L           | 4.8 $\mu$ L           | 4 $\mu$ L          |

る。アクリルアミドゲル溶液を脱気する必要はない。分離ゲル液をゲル板に注ぎ（スラブゲルの場合、スぺーサゲルと濃縮ゲル、サンプルウェルのために、3～5 cm 程度の空間を上に残す）、すぐにスぺーサゲル液をその上に静かに重層する（1～2 cm の高さ）。そして、そのスぺーサゲル液の上に純水を静かに重層し、ゲル化が完了するのを待つ。ゲル化したら、濃縮ゲル（コーム先端からスぺーサゲルとの境界までが1～2 cm の高さ）を作る。

ゲルをセットし、サンプルをロードする。サンプル量は、10  $\mu$ L 程度までに抑えた方がよいようである。サンプルが濃縮ゲルに入りきるまで、30 V を印加し、その後は90 V で最後まで泳動する。表5に示したスラブゲルの条件で、約24時間を要する。分離ゲルにタンパク質が到着したときには90 mA 程度の電流が流れるが、次第に電流量は減少し、泳動終了時には10 mA 程度になる。ゲルの温度が40℃以上にならないようにする。そのために4℃で泳動を行ってもよいであろう。ゲルの厚みによってはより高い電圧を印加することもでき、より短時間で終了する<sup>9)</sup>。

ミニゲルでもスぺーサゲルを通過するまで90 V で泳動し、分離ゲル中で105 V 電圧をかけた場合、約6時間を要する。分離ゲルにタンパク質が到着して105 V の電圧をかけたときに約40 mA 程度の電流が流れるが、泳動終了時には10 mA 程度にまで徐々に減少する。

#### 6.a.4.4 Laemmli の系<sup>11)</sup>

Laemmli により報告され、最も広く利用されている系である。以下のように、ストック溶液を調製する。いずれも室温で保存可能である。未重合のアクリルアミドは高い神経毒性があるので、取り扱いには十分な注意が必要である。また、アクリルアミドを含む廃液は回収し、ゲル化させてから廃棄する。

ストック溶液（いずれも室温保存）

30% アクリルアミド溶液

29.2% (w/v) アクリルアミド、

0.8% (w/v) メチレンビスアクリルアミド

40% アクリルアミド溶液

38.9% (w/v) アクリルアミド、

1.1% (w/v) メチレンビスアクリルアミド  
分離用ゲル緩衝液

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 0.4% (w/v) SDS  
濃縮用ゲル緩衝液

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 0.4% (w/v) SDS  
電極液（ワーキング溶液）

25 mM Tris, 0.192 M Glycine, 0.1% (w/v) SDS

表6に「5 M 尿素, 13.5%均一アクリルアミドゲル溶液（ミニゲル）」のゲル液組成を示した。スラブゲルであれば、分離ゲル液を20 mL 調製すればよい。また、表7に「6 M Urea, 12-18%アクリルアミドゲル溶液（スラブゲル）」の例を示した。先述の「アクリルアミド濃度勾配ゲルの作成」にしたがって、ゲルを作成する。アクリルアミドゲル溶液を脱気する必要はない。アクリルアミド濃度を変更するときは、分離用ゲル緩衝液および尿素有量をそのままにして、アクリルアミド溶液と純水の量を調節する。尿素有量を変更するときは、表3の尿素有量と液体の関係表を参考にして、調節する。

表6：Laemmli の系での5 M 尿素, 13.5%均一アクリルアミドゲル溶液（ミニゲル）

|              | アクリルアミド溶液   |             |
|--------------|-------------|-------------|
|              | 13.5%       | Stacking    |
| 30%アクリルアミド   | 4.5 mL      | 1.6 mL      |
| 分離用ゲル緩衝液     | 2.5 mL      | —           |
| 濃縮用ゲル緩衝液     | —           | 2.0 mL      |
| 尿素           | 3.0 g       | 2.4 g       |
| 純水           | 0.80 mL     | 2.6 mL      |
| (体積)         | (10 mL)     | (8 mL)      |
| 10%過硫酸アンモニウム | 28 $\mu$ L  | 40 $\mu$ L  |
| TEMED        | 5.0 $\mu$ L | 9.0 $\mu$ L |

表 7 : Laemmli の系での 6M Urea, 12-18% アクリルアミド  
ゲル溶液 (スラブゲル)

|               | アクリルアミド溶液   |             |             |
|---------------|-------------|-------------|-------------|
|               | 12%         | 18%         | Stacking    |
| 40% アクリルアミド   | 3.0 mL      | 4.5 mL      | —           |
| 30% アクリルアミド   | —           | —           | 1.6 mL      |
| 分離用ゲル緩衝液      | 2.5 mL      | 2.5 mL      | —           |
| 濃縮用ゲル緩衝液      | —           | —           | 1.6 mL      |
| 尿素            | 3.6 g       | 3.6 g       | 2.9 g       |
| 純水            | 2.0 mL      | 0.5 mL      | 2.8 mL      |
| (体積)          | (10 mL)     | (10 mL)     | (8 mL)      |
| 10% 過硫酸アンモニウム | 20 $\mu$ L  | 15 $\mu$ L  | 40 $\mu$ L  |
| TEMED         | 5.0 $\mu$ L | 5.0 $\mu$ L | 9.0 $\mu$ L |

#### [均一アクリルアミド濃度ゲルの作製]

##### 分離ゲルの作成

1. 分離用ゲル液に過硫酸アンモニウムを加えてあまり泡を立てないように混ぜた後, TEMED をさらに加え, 注意しながら混ぜる。
2. 組み立てたゲル板のなかに(1)の液を静かにそそぎ込む。ガラス板の上端から約 3 cm のところまで入れる (残ったゲル溶液は必ずゲル廃液入れに入れる)。
3. 純水をパスツールピペットを用いて静かに重層する (約 5 mm の高さ)。純水を重層するのが難しい場合は, 水を飽和させたイソブタノールを用いる。
4. 1 時間ほど静置する。アクリルアミドが重合するとゲルの界面が水 (イソブタノール) 層の下に鮮明に見えるようになる。

##### 濃縮用ゲルの作製

1. 分離ゲルの重合が完了したらゲル上面の水 (イソブタノール) を流し出す。
2. 過硫酸アンモニウムを濃縮用ゲル液に加えて手早く混ぜた後, TEMED をさらに加え, あまり泡を立てないように注意しながら混ぜる。分離ゲルと違って急速にゲル化するので素早く行う必要がある。
3. 作製した分離用ゲルの表面を少量の濃縮用ゲル液で共洗う。
4. 濃縮用ゲル液を切れ込みのところまで注ぎ込む。
5. コームの下に気泡が残らないように注意しながら, ゲル板の間にコームを差し込む。重合が完了するとコームの歯の周辺に境界線が見えてくる。

図 3 に示した電気泳動像は, 5 M 尿素, 13.5% 均一アクリルアミドゲル溶液 (ミニゲル) のゲルを使い, 35 mA 定電流で約 1 時間泳動したものである。表 7 に示したようなスラブゲルの場合, 180 mA $\cdot$ h 程度である (12 mA 定電流で約 15 時間)。最近の電子回路型の電源装置では,

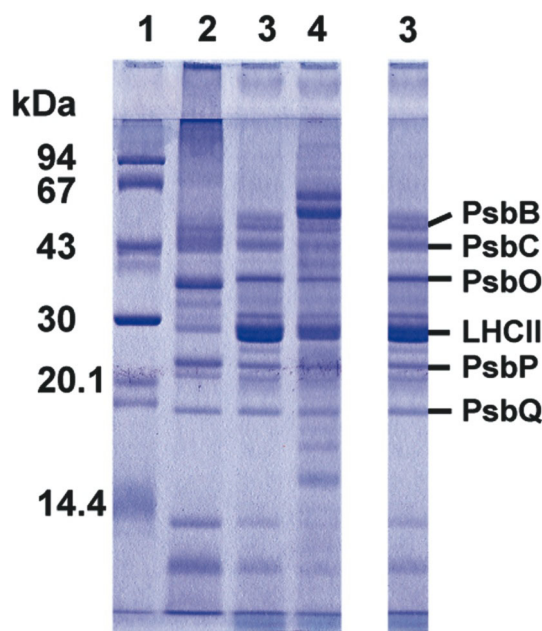


図 3 : Laemmli の系での分離パターン。

5 M 尿素, 13.5% 均一アクリルアミドゲル溶液 (ミニゲル) のゲルを使い, 35 mA 定電流で約 1 時間泳動した。Lane 1, 分子量マーカー; Lane 2, ホウレンソウの光化学系 II コア複合体; Lane 3, ホウレンソウ BBY 標品; Lane 4, ホウレンソウ葉緑体。

低めの仕事量になるようである (約 160 mA $\cdot$ h)。泳動度の再現性を得るためには, いつも同じくらいの電流値で泳動するのが良い。

#### 6.a.5 検出法

##### 6.a.5.1 Coomassie Blue (CBB) 染色

SDS-PAGE 後のタンパク質の検出に広く使われている染色法である。いっぽんには Coomassie Blue R-250 が用いられる。検出限界はタンパク質にも拠るが 8-16 ng である。ダイナミックレンジは, 125-1000 ng<sup>12)</sup> である。使い捨てが一般的であるが, 廃液を減らすために数回の再使用も可能である。染色液の組成は, 0.15% (w/v) Coomassie Blue R-250, 50% (v/v) メタノール, 10% (v/v) 酢酸である。泳動後のゲルを染色液に浸し, 約 1 時間振とうする。染色時間が長くなっても, 一般的には問題はない。温めた純水を使って染色液を調製すると, 染色時間を短くすることができる。脱色液の組成は, 25% (v/v) メタノール, 7% (v/v) 酢酸である。キムワイプ (ティッシュペーパー) を紙縹状にし, ゲルに重ならないように入れておくと, キムワイプが Coomassie Blue を吸着する。キムワイプを取り替えながら脱色を進めていく。脱色液も, 温めた純水を使って調製すると, 脱色の時間

を短縮することができる。

#### 6.a.5.2 ゲルの乾燥

Coomassie 染色や後述の銀染色後、ゲルを乾燥して保存することができる。乾燥中にゲルが割れるのを防ぐために、グリセロール液に浸してから乾燥を行うことが勧められている場合がある。しかし、我々の経験では、十分に脱イオン水に置換した後、比較的低温（50 度程度）で乾燥すれば、割れることなく無事に乾燥が終了する。

乾燥は、濾紙の上にゲルを載せ、セロファンやラップをかぶせた上で行う。乾燥後、ラップははがされるが、セロファンはゲルに密着するので、セロファンを使う際には気泡を除いておく必要がある。

また、ゲルの両面をセロファンで乾燥すると、後々 MS 分析をしたいと思ったときに便利である。目的のバンド・スポットを切り出しやすく、また、純水でゲル状に戻しやすい。目的のバンド・スポットを切り出した後、エッペンドルフチューブなどに純水を入れ、その中に切り出したゲル片を入れると、ゲルが膨潤し、セロファンも自然に剥がれる。この膨潤したゲル片で通常のゲル内消化を行い、MS 分析サンプルにすることができる<sup>6)</sup>。濾紙を台紙にして乾燥した場合も同様に MS 分析に用いることができるが、膨潤したゲル片から濾紙の繊維を取り除くのに手間取ることが多い。

#### 6.a.5.3 銀染色

Coomassie Blue では染色できないほどの微量のタンパク質でも染色することが可能である。検出限界は、タンパク質にも拠るが、0.5 ng 程度<sup>13)</sup>である。ダイナミックレンジはそれほど広くなく、4-60 ng 程度の間で染色度の線形性が得られる<sup>12)</sup>。染色キットが市販されているが、我々は以下の手順で染色している。大きめのパットで操作すると、染色ムラを少なくすることができる。なお、この方法で染色したタンパク質バンド・スポットは、MS 分析に用いることができる。また、Coomassie Blue で染色・脱色した後のゲルでも、引き続き銀染色を行うことができる。廃液は、研究機関の規則に従って処理を行う。

##### [染色方法]

1. ゲルを 40% (v/v) エタノール、10% (v/v) 酢酸を含む溶液で、少なくとも 30 分間、平衡化させる。Coomassie Blue 染色後に十分に純水に平衡化させたゲルであれば、このステップは省略する。
2. 純水で、数回洗う（10 分、3 回程度）
3. 320  $\mu$ M DTT 溶液（32  $\mu$ L 1 M DTT/100 mL）に約 30 分間、平衡化させる。Coomassie Blue で染色した

後のゲルであれば、この DTT 溶液での平衡化を行わないと、発色されない。

4. 0.2% AgNO<sub>3</sub> 溶液（0.2 g/100 mL）で 30 分の平衡化。
  5. 純水でゲルを数回洗う。このステップは必ずしも必要でないが、このステップを入れた方が仕上がりが綺麗である。
  6. 発色液（15 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.25mL HCHO/500mL）を加える。この際、染色ムラを防ぐため、ゲルの上面・下面に速やかに、なるべく均等に行き渡るようにする。
  7. 染色具合を確認しつつ、静かに振とうし、適度な発色が得られたら反応停止液（10% (v/v) 酢酸）と交換する。
  8. 反応停止液にしばらく平衡化させる。
  9. 発色が強すぎてバックグラウンドが濃くなりすぎたら、Farmer's reducer（0.19 g FeCN, 2.4 g Na<sub>2</sub>-thiosulfate/250 mL）に浸し、振とうする。適度なバックグラウンドになったら、速やかに純水と交換し、数回洗う。Farmer's reducer に長時間浸すと、すべてが脱色されてしまう。
  10. 純水に平衡化した後、スキャナで画像化する、MS 分析のサンプル処理を行う、乾燥する、等の処理を行う。
- #### 6.a.5.4 SYPRO Ruby や Flamingo による検出

蛍光検出装置の普及により、SYPRO Ruby や Flamingo 等による検出が容易に行われるようになってきた。これらの手法による検出限界は銀染色と同程度であり<sup>13)</sup>、また、ダイナミックレンジは 1-1000 ng と<sup>12)13)</sup>、銀染色と Coomassie Blue 染色の両方をカバーする。操作は Coomassie Blue と同様、いたって簡便である。泳動後のゲルを染色液に 3 時間程度平衡化させ、蛍光イメージング装置で画像化する。特定のバンド・スポットを切り出すためには、専用の装置が必要となる。これらの手法で染色したゲルも、改めて Coomassie Blue で染色することができるので、必要があれば Coomassie Blue 等で染色し直してバンド・スポットを切り出すということも可能である。

#### 6.a.5.5 フィコビリントタンパク質の検出

ラン色細菌や紅藻など、フィコビリゾームを含む材料を取り扱う場合、フィコビリントタンパク質を感度良く検出できると便利である。電気泳動後のゲルを、トランスイルミネータに載せ、紫外線を照射することで、フィコビリントタンパク質を発色させることができる。また、硫酸亜鉛 (ZnSO<sub>4</sub>) 溶液を使うことで検出感度を高くする方法も報告されている<sup>14-16)</sup>。この方法では、色のついてい

ないリンカータンパク質も検出することが可能である。

#### 6.a.5.6 ヘム染色

光合成電子伝達系の構成成分として知られている *c* 型シトクロムがある。多くの酸素発生型非緑色光合成生物の光化学系II複合体に結合している PsbV (cyt *c*550) や、シトクロム *b* 6/*f* 複合体のシトクロム *f* 等である。これらのタンパク質バンドを電気泳動後に定量的に検出する場合、ヘム染色が有効である。ただし、ヘムタンパク質ごとに染色度が異なるので<sup>17)</sup>、異なるヘムタンパク質間の量的な比較は困難である。また、とくに注意すべき点は、タンパク質の変性液に含まれる DTT (dithiothreitol) は新鮮でないといけないということである。通常の SDS-PAGE では、変性液の凍結・融解を繰り返していても大きな問題はないようであるが、ことヘム染色に関しては DTT の鮮度は大きな問題である。新鮮な DTT でないと、ヘム染色されないばかりか、Coomassie Blue で染色したヘム蛋白質のバンドも不鮮明になることもある。ここでは、蛍光イメージング装置を使った検出法 (ECL 法<sup>17)</sup>) と、Diaminobenzidine (DABZ) を使った方法とを紹介する。ECL 法では、引き続いてウェスタンブロットを行うことができる。ウェスタンブロットのついでにヘム染色を行うことができるわけである。また、ECL 法では、DABZ 廃液も生じない。

#### [ECL 法]<sup>6,18)</sup>

ECL 反応液を用意する。我々は、Pierce 社の WestFemto を使っている<sup>19)</sup>。同じ会社の WestPico では感度が不十分なことが多い。

1. SDS-PAGE 後、あるいは Native PAGE 後、Western blotting の方法により、PVDF 膜にブロットする。
2. ブロット終了後、PVDF 膜を軽く純水で洗う。そして OHP フィルム上に WestFemto (Pierce 社) を適量、混合し、PVDF 膜の両面を反応液になじませる。そして、気泡を挟まないように、OHP フィルムを被せる (OHP フィルムで PVDF 膜を挟む)。ラップでも可能であるが、反応液のムラを除くためには OHP フィルムが良い。
3. 蛍光イメージング装置で画像を取り込む。または、X線フィルムに感光させ、現像する。
4. PVDF 膜をアミドブラック (0.1% (w/v) Amido black-10B, 10% (v/v) メタノール, 2% (v/v) 酢酸) で染色し、スキャナで画像化する。脱色は、純水のみで行う。
5. 必要であれば、ウェスタンブロットに進む。

#### [DABZ 法]

1. SDS-PAGE の終了したゲルを純水で約 20 分、振とう。途中、純水を数回、交換する。
2. 純水で平衡化している間に、水 50 ml に対して 0.2 g の 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DABZ-4HCl) を溶かし、それにメタノール 25 ml と Citric Buffer (1 M citrate-NaOH/pH 4.7) 25 ml を加えたものを調製しておく。
3. 純水を捨て、上記 DABZ 液に置換し、1 時間程度の振とうを行う。
4. 終濃度 2 % となるように過酸化水素水を加え、発色させる。
5. 十分に発色させた後、純水で数回の洗浄を行う。

#### 6.a.5.7 ウェスタンブロット<sup>20)</sup>

SDS-PAGE や Native-PAGE で分離したタンパク質を特異的な抗体を用いて検出・同定する方法である。スウェーデンの AgriSera (<http://www.agrisera.se/>) が光合成関連の抗体を各種取り揃えている。

電気泳動後、PVDF 膜やニトロセルロース膜にタンパク質を転写し、BSA やスキムミルク等でブロッキングを行った後、特異的な抗体 (一次抗体)、二次抗体と反応させ、二次抗体に結合させた HRP などの活性を利用して検出を行う。一次抗体は通常、数百倍に希釈して使用し、再使用することが多い。この場合、防腐剤が必要である。一般的には、HRP 結合の二次抗体を使用する場合、アジ化ナトリウムはその活性を阻害するために一次抗体の保存にもアジ化ナトリウムは使ってはならないことになっている。しかし、一次抗体を反応させた後、PVDF 膜 (ニトロセルロース膜) を十分に洗浄するため、防腐剤としてアジ化ナトリウムが入っていたとしても二次抗体を作用させる前に洗い流されるようで、実際問題としてはアジ化ナトリウムの使用は問題ない。アルカリフォスファターゼ結合の二次抗体の場合も、同様であろう。

ブロッキング終了後、前述のヘム染色操作 (ECL 法) で *c* 型シトクロムの検出を行ってからウェスタンブロットを進めることが可能である。

#### [実験方法]

予め用意しておく溶液。

TBSX solution

20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 M NaCl, 0.1% Triton X-100

(バックグラウンドの低減のためには、ナカライの Triton X-100 が良いようである)

Blocking solution

1% BSA in TBSX

Antibody buffer

1% BSA/TBSX

Blotting buffer (Transfer buffer)

0.1 M Tris, 0.192 M Glycine, 5% Methanol,

0.02% SDS

BSA の代わりにスキムミルクを使うこともできる。

#### [操作]

1. 電気泳動を行う。
  - ・試料タンパク質量は Coomassie Blue 染色の場合の 1/5 から 1/10 でよい。
2. 電気泳動終了後、ゲルを切り出し、Blotting buffer に浸して振とうする。
3. ゲルを振とう・平衡化し始めて 15 分ほど経ったら、ゲルを採寸する。

平衡化中にゲルが伸張する場合は、しばらく浸漬してから採寸するとよい。アクリルアミド濃度勾配ゲルの場合は、ゲルの下端側が若干伸張しやすいようである。
4. この大きさに合わせて PVDF 膜 (ニトロセルロース膜) (1 枚) と厚手の濾紙 (8 枚) を切り出す。PVDF 膜 (ニトロセルロース膜) や濾紙は、ゲルよりも 5 mm 以上は大きくないように切り出す。
5. 切り出した PVDF 膜を 100% メタノールに浸す。短時間でよいが、ムラなく浸す。ニトロセルロース膜の場合、必要ない。
6. メタノールを Blotting buffer に置換し、振とうしながら浸漬する。置換後すぐは注意深く攪拌し、Blotting buffer に馴染ませるようにする。なるべく空気に触れないようにしないと、転写後の膜への保持効率が悪くなるようである。
7. セミドライタイプの転写装置の下部電極板に Blotting buffer をむらなく広げる。
8. この電極板の上に、Blotting buffer に浸しておいた濾紙を 1 枚ずつ 4 枚重ねる。このとき気泡が濾紙と電極板の間、および濾紙と濾紙の間にできないように、濾紙の下を空気を押し出すように濾紙を載せていく。
9. 4 枚重ね濾紙の上に PVDF 膜を気泡ができないように素早く重ね、また素早くその膜の上に Blotting buffer を注ぐ。
10. 気泡が入らないようにゲルを載せる。このとき、できるだけゲルの裏表を確認して載せる。転写後 PVDF 膜をレーンに合わせて切り出す必要がある場合、後で切りわけ易いように、膜の上にレーンの境目を鉛筆で

印をつけておくとよい。

11. さらに、Blotting buffer をゲルの上に少量注ぎ、Blotting buffer に浸しておいた濾紙を先ほどと同様に 1 枚ずつ 4 枚重ねる。
12. さらに Blotting buffer を少量注ぎ、次いで上部電極と濾紙との間に気泡が入らないように、注意深く上部電極を載せる。上部電極をやや傾けて載せると、気泡が押し出される。このような手順で行うと、濾紙の間などに気泡ができにくいので、上部電極を載せる前にローラーなどで気泡を押し出す操作をしなくて済み、また、Blotting buffer も濾紙などに充分保持される。
13. 極性を確認して電源に繋ぎ、通電を始める。
  - ・通電は、ゲル面積 1 cm<sup>2</sup> 当り 2.0 mA 定電流に設定し、約 45 分通電する。通電直後は 10 V 程度で、時間が経つにつれて電圧が高くなっていく。
  - ・通電時間等はゲル、試料によって異なるので、条件設定をした方がいい場合もある。
14. 終了後、必要に応じ、ヘム染色を行う。
15. アミドブラック、ボンソーなどで染色し、その後、脱色する。
16. スキャナで画像を記録する。
17. PVDF 膜 (ニトロセルロース膜) を Blocking Solution に浸し、膜上のタンパク質がない部分をコーティングする。振盪しながら約 30 分。
18. 一次抗体を反応させる。振盪しながら 30 分～一晩。
19. 反応後の PVDF 膜を TBSX で洗う。5 分間 x 4 回程度。
20. 二次抗体 (Horseradish Peroxidase-conjugated IgG) を反応させる。振盪しながら 30 分～1 時間。1% BSA/TBSX で希釈して使う。
21. PVDF 膜を TBSX で洗う。5 分間 x 4 回程度。
22. OHP フィルムに ECL 液 (Pierce 社の WestPico 等) を載せ、PVDF 膜 (ニトロセルロース膜) の両面を反応液になじませる。そして、気泡を挟まないように、OHP フィルムを被せる (OHP フィルムで PVDF 膜を挟む)。
23. 蛍光イメージング装置で画像を取り込む。または、X 線フィルムに感光させ、現像する。
24. 必要に応じ、別の一次抗体を反応させる。この場合、前の一次抗体をはがすための処理もあるが、完全に取り除くことは難しい。

#### 6.a.5.8 N 末端アミノ酸配列の解析

ウェスタンブロットと同様にして、プロットィングを行い、アミドブラックなどで染色する。電気泳動の際、Tris/Glycine 系の泳動バッファを使わないようにとの

指示がある場合もあるが、問題ないようである（装置によるのかもしれない）。

Blotting buffer の組成は、50 mM Tris, 30 mM Boric acid, 0.02% (w/v) SDS, 5% (v/v) methanol である。pH を調製していない 1 M Tris 溶液と、0.5 M Boric acid 溶液を用意しておくと、Blotting buffer の調製が容易である。

ゲル面積 1 cm<sup>2</sup> 当り 2.0 mA 定電流に設定し、約 45 分通電する。通電直後は 20 V 程度で、時間が経つにつれて電圧が高くなっていく。ブロッキング終了後はアミドブラック等で染色し、バンドを確認する。フォルミル化によるブロッキングを除くために、0.6 N HCl で一晩、インキュベーションを行っても良い。その場合は、純水で十分に洗浄を行う。

## 参考文献

- 1) Z. J. Lorkovic, W. P. Schroder, H. B. Pakrasi, K. D. Irrgang, R. G. Herrmann, & R. Oelmuller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** (1995) P.8930.
- 2) Y. Kashino, T. Takahashi, N. Inoue-Kashino, A. Ban, Y. Ikeda, K. Satoh, & M. Sugiura, *Biochim. Biophys. Acta* **1767** (2007) P.1269.
- 3) N. Inoue-Kashino, T. Takahashi, A. Ban, M. Sugiura, Y. Takahashi, K. Satoh, & Y. Kashino, *Photosynth Res* **98** (2008) P.323.
- 4) Y. Kashino, W. M. Lauber, J. A. Carroll, Q. Wang, J. Whitmarsh, K. Satoh, & H. B. Pakrasi, *Biochemistry* **41** (2002) P.8004.
- 5) Y. Kashino, *J. Chromatogr. B* **797** (2003) P.191.
- 6) Y. Kashino, T. Harayama, H. B. Pakrasi, & K. Satoh, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **849** (2007) P.282.
- 7) M. Ikeuchi & Y. Inoue, *Plant Cell Physiol.* **29** (1988) P. 1233.
- 8) H. Schägger & G. von Jagow, *Anal. Biochem.* **166** (1987) P.368.
- 9) H. Schägger, *Nat. Protoc.* **1** (2006) P.16.
- 10) Y. Kashino, H. Koike, & K. Satoh, *Electrophoresis* **22** (2001) P.1004.
- 11) U. K. Laemmli, *Nature* **227** (1970) P.680.
- 12) K. Berggren, E. Chernokalskaya, T. H. Steinberg, C. Kemper, M. F. Lopez, Z. Diwu, R. P. Haugland, & W. F. Patton, *Electrophoresis* **21** (2000) P.2509.
- 13) J. C. Nishihara & K. M. Champion, *Electrophoresis* **23** (2002) P.2203.
- 14) T. R. Berkelman & J. C. Lagarias, *Anal Biochem* **156** (1986) P.194.
- 15) S. Raps, *Plant Physiol* **92** (1990) P.358.
- 16) T. Lamparter, F. Mittmann, W. Gartner, T. Borner, E. Hartmann, & J. Hughes, *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (1997) P. 11792.
- 17) C. Vargas, A. G. McEwan, & J. A. Downie, *Anal Biochem* **209** (1993) P.323.
- 18) Y. Kashino, N. Inoue-Kashino, J. L. Roose, & H. B. Pakrasi, *J. Biol. Chem.* **281** (2006) P.20834.
- 19) C. S. Beckett, J. A. Loughman, K. A. Karberg, G. M. Donato, W. E. Goldman, & R. G. Kranz, *Mol Microbiol* **38** (2000) P.465.
- 20) H. Towbin, T. Staehelin, & J. Gordon, *Proc Natl Acad Sci U S A* **76** (1979) P.4350.