

第4節 電気泳動

4.1 タンパク質の電気泳動 (SDS-PAGE)

【原理】 SDS-PAGE 法は、強力な陰イオン界面活性剤である SDS (ドデシル硫酸ナトリウム, sodium dodecyl sulfate, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}^+$) 存在下において蛋白質をほぼ均一に変性させてポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、分離・分析するものである。SDS は蛋白質の疎水性領域および正電荷に富む領域にミセル状に結合し、多くの場合平均してタンパク質 1 g あたり 1.4g 結合する。泳動時の SDS-ポリペプチド複合体の実際の構造は不明であるが、その長さでポリペプチドの分子量の間に比例関係が成立するほどに伸びた構造をとると考えられ、これらはアクリルアミドの架橋によって生じたゲルの分子篩によって分子量を反映して分離される。SDS-PAGE 法は、用いるゲルによって連続緩衝液法と不連続緩衝液法の二種に大別される。後者は、pH の異なる 2 種類のトリス塩酸緩衝液を含むアクリルアミドゲル (濃縮ゲル, 展開ゲル) ならびにトリス・グリシン泳動用緩衝液を用いることで濃縮ゲル内において試料蛋白質を濃縮でき、複雑な組成の蛋白質試料の高度な分離に適している (図 1)。すなわち、pH6.8 の濃縮ゲルにおいては塩素イオンとグリシンは荷電の大小が顕著であるため不連続な界面を生じながら陽極方向へ移動するが、それらの中間的な荷電を有する SDS-ポリペプチド複合体は界面に挟まれた薄い層になって移動する。しかし、pH8.8 の分離用ゲルにおいてはグリシンの荷電が大きくなり SDS-ポリペプチド複合体を追い越して先へ進むので、上述のごとく試料は分子篩によって分離する。

【安全上の注意】ゲル作製に用いるアクリルアミドモノマーは催涙性と皮膚刺激性をもつ神経毒なので、防護手袋をして取り扱う。廃棄するときにはポリアクリルアミドに重合させて無毒化してからゴミ箱へ捨てる (排水口が詰まるので、決して流しに捨ててはならない)。また、通電中は感電の恐れがあるので、泳動槽にはフタをすること。

【試薬】

- ゲル作製試薬：アクリルアミドストック溶液、1.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH8.8, 0.4%SDS を含む)、0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH6.8, 0.4%SDS を含む)、10% SDS、10%過硫酸アンモニウム、TEMED (N,N',N'',N'-テトラメチレンジアミン)、蒸留水、2-プロパノール。
- SDS 処理試薬 (×6)：60% グリセロールと 6% SDS と及び 0.06% プロモフェノールブルー (着色剤) を含む 0.6 M トリス塩酸緩衝液 (pH6.8) —還元処理を行う場合は最終濃度 20%となるよう 2-メルカプトエタノール ($\text{CH}_2(\text{SH})\text{CH}_2\text{OH}$) を添加する。
- その他：泳動用トリス・グリシン緩衝液 (pH8.2)、分子量マーカータンパク質 (プレステインタイプ)、クマシーブリリアントブルー溶液 ($\text{C}_{45}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}_2$, タンパク質染色液)、10%酢酸 (ゲル脱色液)

【器具】泳動装置、定電圧装置、ドライブロック加熱装置、ゲル作成装置一式 (ガラス板、シリコンチューブ、クリップ、コームなど)、染色・脱色用シェーカー、染色用プラスチックケース、ナイフあるいはコテ (ゲル板をこじ開けたり、ゲルをガラス板からはずすのに使用)、ビーカー (ゲル作成用、廃液入れ)。

【操作】

- 1) ガラスプレートを組み立てる。小型ビーカーに 2 mL のアクリルアミドストック溶液、

1.5 mL のトリス塩酸緩衝液 (pH8.8), 2.5 mL の蒸留水を混合し, スターラーで攪拌しながら減圧脱気する. 4 μ L の TEMED と 30 μ L の過硫酸アンモニウムを加えて混合したあとガラスプレートに流し込み, 2-プロパノールを重層して1時間以上放置し, 10% 分離ゲルを作成する.

- 2) 別の小型ビーカーに 0.6 mL のアクリルアミドストック溶液, 1.0 mL のトリス塩酸緩衝液 (pH6.8), 2.4 mL の蒸留水を混合し, スターラーで攪拌しながら減圧脱気する. 4 μ L の TEMED と 20 μ L の過硫酸アンモニウムを加えて混合してから 2-プロパノールを除いた分離ゲルの上に流し込み, コームをセットして 30 分以上放置し, 4.5%濃縮ゲルを作成する.
- 3) タンパク質溶液 50 μ L に SDS 処理試薬 (X6) を 10 μ L 加え, ドライブロック加熱装置を用いて 100°C で 5 分間加熱する. 還元処理を行うサンプルについては, 2-メルカプトエタノールを添加する.
- 4) 泳動ゲルを泳動槽にセットし, 上記で調製したサンプルを 1 レーン当たり 10 μ L ずつマイクロピペットを用いて注入する.
- 5) ゲル 1 枚当たり 40mA の定電流で泳動する. 約 1 時間で泳動が終了する (プロモフェノールブルーの青いラインがゲルの先端から 1 cm くらいにくるまでが目安).
- 6) コテを用いてガラス板をこじ開け, 濃縮ゲルをコテを用いて取り外した後, ゲルの左下を少し切り取り (左右を取り違えないため), クマシーブリリアントブルー溶液の入ったプラスチックケースに移す.
- 7) 30 分程度染色後, クマシーブリリアントブルー溶液をビーカーに移し, 代わりに脱色液を入れる. このときキムワイブなどを入れておくと色素吸着剤として機能して, 脱色が促進される. 完全に脱色するには 1 夜必要.

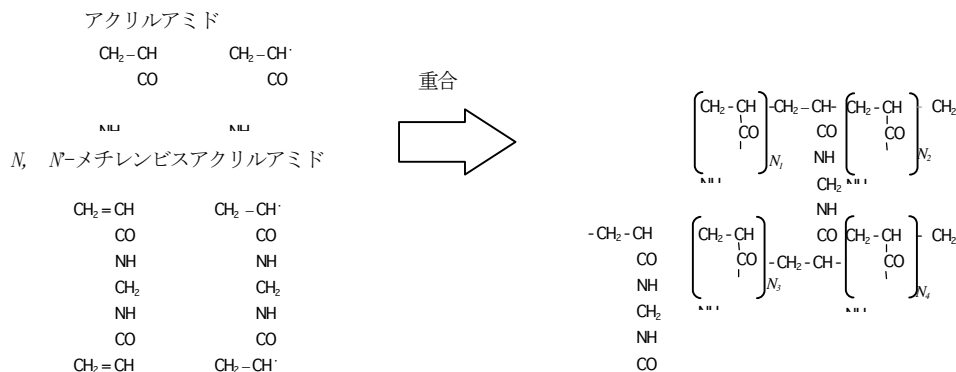


図 1.アクリルアミドの重合

4.2 DNAの電気泳動 (アガロース)

【原理】 核酸の基本構造は糖 (リボースもしくはデオキシリボース) とリン酸 (-P04) が交互に結合した直鎖構造上に塩基が並んだ形をしている. このため, pH が中性付近にあるときは, スクレオチド毎に 1 個のリン酸基の電離による負電荷をもつ. スクレオチド数と荷電量が常に比例するため, 核酸は電場の中では質量あたりほぼ一定の力で陽極へ引かれることになる. DNA では 2 本鎖の塩基が相補的に水素結合しているため塩基間の相互作用はなく, 直鎖状の形状をしている. これに対して RNA は一本鎖であり, 分子内の塩基相互作用により様々な立体構造を取り得る. 電気泳動速度は, 分子の荷電量, 分子量および形状に左右されるため, RNA を電気泳動

法によって分離する場合には、分子間の相互作用を抑制する試薬（ホルムアルデヒドなど）の添加が必要となる。2本鎖DNA分子では荷電量が質量に比例すること、形状がすべて直鎖状であることから、ポリアクリルアミドやアガロースの網目構造中の移動速度はこれら支持体と分子との相互作用によって決まる。支持体との相互作用は分子量が大きいものほど増大して移動速度を遅くするため、DNA分子を大きさ（塩基対数）によって分離することができる。すなわち、小さい分子ほど泳動距離が長く、大きい分子ほど泳動距離が短くなる。支持体にポリアクリルアミドを用いた場合には、1塩基対の差異を検出できる精度がある反面、1,000bp以上の大きさをもつDNA分子の分離はできない。一方、アガロースを用いた場合にはポリアクリルアミドほどの精度は期待できないが、極めて広範囲のDNA分子（200bp～50kb）の分離が可能である。なお、通常の電気泳動条件では40kbを越えるDNA分子のアガロース中での移動速度は分子量によらずほぼ一定となるため、電気泳動での分離は困難となる。数Mbpの巨大DNA分子を分離するためには、電場の方向をゲルに対して0.1秒から0.001秒の間隔で切り替えるパルスフィールド電気泳動法が必要となる。

【試薬】

- 泳動用緩衝液組成**：1×TAEは50×TAEをストック溶液として予め作成しておき、必要に応じて希釈して用いる。50×TAE(1リットル)はTris 242g, 氷酢酸 57.1ml, 0.5M-EDTA (pH8.0) 100mlを混合して、蒸留水で1リットルに調整する。0.5×TBEは5×TBEをストック溶液とする。5×TBE(1リットル)はTris 54g, ホウ酸 27.5g, 0.5M-EDTA (pH8.0) 20mlを混合して、蒸留水で1リットルに調整する。電気泳動にはどちらを使用しても大差はない。ただ、TAEの方がTBEよりも緩衝能が低いいため、長時間の泳動をする場合にはTBEの方が無難である。また、TAEの分離能は高分子ではTBEよりもやや高いが、低分子ではTBEよりもやや低い。
- アガロース**：アガロースはテングサ (*Gelidium spp.* または *Gracilaria spp.*) から抽出された寒天（アガロース）を精製したものであり多種類の製品が市販されているが、大きく分けて高融点アガロース（標準）と低融点アガロースがある。低融点アガロースは、アガロースに化学的な修飾を加えて通常（85～95℃）よりもはるかに低い融点（65℃～40℃）をもたせた製品であり、ゲルからDNAサンプルを回収する場合に使用する。アガロース濃度が低いほど高分子DNAの分離能が高くなるが、ゲルの強度が減少してゲルが壊れやすくなる。カタログに記載されている融点、ゲル強度を参考にして、自分の目的にあったアガロースを使用する。なお、EEO（電気浸透）とは支持体であるアガロースがマイナスに荷電し緩衝液との接触面で緩衝液にプラスの電荷を誘導する現象である。電気浸透が大きいと緩衝液中にDNAの移動とは逆方向、すなわちマイナス極側に移動する緩衝液の流れが生じDNAの移動を妨げる。ポリアクリルアミドでは電気浸透は極めて小さいが、アガロースでは10kb以下のDNA分子を分離する場合に電気浸透の影響が大きくなる。アガロースはゲル化した状態でL-ガラクトースとD-ガラクトースが α -(1-3)もしくは β -(1-4)結合によって連結された構造をとる。ゲル濃度を薄くすれば3次元網目構造の「目」が粗くなるため、高分子のDNAに対する分離能がよくなる。下表は濃度と分離するDNA分子の塩基対数との関係のおおよその目安であるが、詳細は製品毎に異なる。

アガロース量% (w/v)	分離に適した直鎖状の2本鎖 DNAのサイズ (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

- エチジウムブロマイド（臭化エチジウム）**：10mg/mlのストック溶液（水溶液）を予め作成しておく。ゲルに加える場合には最終濃度が5 μ g/mlになるように加える。泳動後にゲルを染色する場合は、ゲル作成時に用いた緩衝液に上記と同じ濃度になるようにストック溶液を加えたものを染

色液とする。エチジウムブロマイドは DNA 分子の塩基対がつくる平面と平面の間に入り込み（インターカレーション）、エチジウムブロマイド自身の紫外線吸収（302～366nm）および DNA が吸収する紫外線（254nm）のエネルギー転移によって励起されて蛍光（590nm）を放射する性質をもつ。したがって、ゲルをエチジウムブロマイドで染色した後、紫外線照射下で観察すればゲル中の DNA の位置を確認することができる。なお、エチジウムブロマイドが DNA と結合すると DNA の泳動速度を約 15%減少させるため、予めゲルに添加して電気泳動する場合には注意が必要である。

【安全上の注意】

エチジウムブロマイドは DNA と結合して、正確な転写や複製を阻害するため、極めて発ガン性の高い物質である！！エチジウムブロマイドが入った溶液やゲルの取り扱いには必ず使い捨てのポリ手袋などを着用して行うこと。エチジウムブロマイドが混ざった状態の緩衝液（ゲルにエチジウムブロマイドを添加した場合）は、以下の要領でエチジウムブロマイドを除去してから廃棄する。まず、廃液に 1mg/ml の活性炭を加えてよく混合し、12 時間室温に放置する。廃液を濾紙（ワットマン No. 1）で漉してから廃棄する。エチジウムブロマイドは高温で無毒化されるので、濾紙は焼却処分すればよい。ゲルも同じことなので、焼却処分すればよい。

- ゲル・ローディングバッファー：0.25%のブロモフェノールブルー(BPB)および 0.25%キシレンシアンール FF(XC)を 30%のグリセロールに溶かして調整する。ローディングバッファーは DNA 溶液に着色して比重を重くするために用いる。これによりウェルへの注入が容易になるばかりでなく、泳動の確認も可能になる。BPB は XC の約 2.2 倍の速度で正極へ泳動され、0.5×TBE 緩衝液中では BPB は 0.3kb、XC は 4kb の 2 本鎖 DNA とほぼ同じ泳動速度を示す。ただし、用いるアガロース濃度が高くなると必ずしも当てはまらない。

【器具】

電気泳動槽、電源装置およびゲル作成型（ミューピッド）、三角フラスコ 300ml、ラップフィルム、マイクロピペット（20 μ l 用）

【操作】

- 1) 泳動する DNA の分子量のおおよその範囲から用いるアガロースの最適濃度を決定する。分子量 (bp) が大きい場合には低濃度のゲルで、小さい場合には高濃度ゲルを用いる。
- 2) ミニゲル大に約 40ml、ミニゲル小に約 20ml のアガロース液が必要である。これより量を減らせばゲルが薄くなり、増やすとゲルが厚くなる。厚くすればゲルにできる穴（ウェル）の容積が増大してより多くのサンプルを泳動することができる。大では約 6.5ml、小では約 3ml ゲル量が増えるとウェル容量は約 4.5 μ l 増える。しかし、大では 65ml、小では 30ml を超えるとゲル作成型から溢れるので、泳動するサンプル量が多い場合にはコームの幅が広い方を用いるようにする。同量のゲルなら、広いコームの容量は狭いコームの容量の約 1.5 倍である。使うコームとゲル型が決まったら、ゲル作成型に大もしくは小のゲル型をはめ込んで、コームを差ししておく。
- 3) アガロース濃度およびゲル量が決まったら、三角フラスコに必要な量のアガロースと必要量の泳動用緩衝液を測り入れて、電子レンジで加熱する。100ml のゲルを作成する場合には、300ml の三角フラスコを利用し、作成するゲル容量に対して倍以上の容量をもつ容器を使うようにする。さもないと、ゲル溶液が沸騰したときに溢れてしまうことになる。沸騰するまで加熱を続けアガロースを完全に溶かす。三角フラスコを取り出して振り混ぜた時に、ゆらゆらとした感じで溶液中を泳ぐものがあれば、それは溶けていないアガロースである。沸騰によって減少する水分を補う必要がある場合には蒸留水も一緒に加熱しておき、減った重量分を足すようにすればよい（決して冷水を注いではならない）。加熱されたアガロース溶液は突沸する場合があるので、三角フラスコを取り出す際には注意すること。なお、加熱された三角フラスコは素手ではもてないほど熱いので、必ず軍手もしくはキムタオルを利用すること。
- 4) 標準品のアガロースであれば、ゲル固化温度は 50 $^{\circ}$ C 以下である。ゲル作成型に直接高温のアガロースを流し込むことを続けると変形の原因になるので、素手で触れる程度まで冷めてから一気に流し込むようにする。ゲルに予めエチジウムブロマイドを添加する場合にはゲル容量の 1/2,000 を（100ml なら 50 μ l）加える。ゲル固化後の取り扱いには十分注意すること。コームの間や先端に気泡ができた場合にはイェローチップなどの先端でつついて取り除く。
- 5) 30 分程度してゲルが固まったら、ゲル表面にゲル作成時に用いた緩衝液を注いでから、コーム

を静かに抜き取る。コームの先端とゲルの底面との間は 1mm 程度である。コームを乱暴に抜くとウェルの底とコームの先端との間に生じる陰圧によってウェル底が破損することがある。ゲル型ごと電気泳動槽に入れて、ゲル作成時に用いた緩衝液で泳動槽を満たす。このときの液面はゲルから 1mm 程度上にする。

- 6) 分析する DNA 溶液の入ったマイクロチューブにゲル・ローディングバッファーを 1/5 量程度入れピペット操作でよく混合してからウェルに注入する。
- 7) ミューピッドの蓋を閉め（蓋が安全装置を兼ねている）電圧を 100V もしくは 50V にセットしてから、電源スイッチを入れる。通電すれば電極から小さい泡が出るのが確認できる。BPB もしくは XC の泳動距離を見ながら泳動時間を決める。通常は BPB がゲルの 2/3 程度まで移動したところで泳動を止める。
- 8) ゲルを型ごと泳動槽から取り出して、ラップフィルムの上にゲルを型から押し出して乗せる。エチジウムブロマイドを添加している場合には、ラップフィルムごと直接トランスイルミネーター上に置いて紫外線を照射してゲルを撮影する。ゲルをエチジウムブロマイドで染色する場合には、染色液に 20~30 分漬けてから同様にしてゲルの撮影を行う。