

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（均一濃度ゲル）

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は生物薬品中のタンパク質の特性解析，及び純度試験や定量試験に用いられる。

特に、生物薬品中のタンパク質の同定及び均一性の評価に適した分析方法である。また、タンパク質のサブユニットの分子量の推定並びに精製タンパク質のサブユニット組成の決定に日常的に用いられる。

既存のゲル及び試薬類が広く市販されているが、これらの市販品を用いた場合でも同等の結果が得られ、かつ、後述するバリデーションを行い、その基準に適合する限り、以下の方法に代って利用して差し支えない。

1. ポリアクリルアミドゲルの特性

ポリアクリルアミドゲルの分子ふるい効果は、隣接するポリアクリルアミド鎖と交差結合するビスアクリルアミドによって形成される繊維と孔の三次元網目構造により得られる。この重合反応は過硫酸アンモニウム及び N, N, N', N' テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) からなるフリーラジカル生成系により通常触媒される。

ゲルのアクリルアミド濃度が増加すると有効孔径は減少する。ゲルの有効孔径は分子ふるい効果によって実験的に求められる。すなわち、巨大分子の移動を妨げる程度によって決められる。利用できるアクリルアミドゲル濃度には限界がある。ゲルの孔径が減少するに従い、タンパク質のゲル中の移動速度は減少する。アクリルアミドの濃度を調整して孔径を調節することによって、本法の解像度を目的タンパク質に対して最適化させることができる。このようにゲルの物理的な性質はアクリルアミドとビスアクリルアミドの組成によって定まる。

ゲルの組成に加え、タンパク質の状態も電気泳動の移動度を決定する重要な要因となる。タンパク質の電気泳動の移動度は荷電する基の pK 値及びタンパク質分子のサイズに依存する。また移動度は支持材料の性質と同様に、緩衝液の種類、濃度及び pH ，又は温度及び電界強度などによっても影響を受ける。

2. 変性条件下ポリアクリルアミドゲル電気泳動

以下に例示する方法は質量 14000~100000 ダルトンの単量体ポリペプチドの分析に適用するものである。いろいろな技術（例えばグラジエントゲル，特殊な緩衝液系）によってこの質量範囲を広げることが可能である。例えば、ここで述べる方法では後端イオンとしてグリシンの代わりにトリシンを用いるトリシン-SDS ゲルは 10000~15000 ダルトン以下の非常に小さなタンパク質及びペプチドを分離できる。

グリシンドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用いる変性条件下のポリアクリルアミド電気泳動法 (SDS ポリアクリルアミド電気泳動法) は、タンパク質性生物薬品の品質評価に最も一般的に利用される電気泳動法であり、以下の方法もこれを中心に記述する。一般に、タンパク質を電気泳動により分析する際には、タンパク質をポリペプチドの各サブユニッ

トに解離させ、また凝集を最小にするような条件にしたポリアクリルアミドゲル中で分析を行う。通常はタンパク質をゲルに添加する前に強陰イオン界面活性剤である SDS と熱により解離させる。変性したポリペプチドは SDS と結合して負に荷電し、タンパク質の種類とは無関係に一定の電荷—質量比を示す。SDS の結合量はほとんどの場合ポリペプチドの分子量に比例しており、そのアミノ酸配列に依存しないため、SDS—ポリペプチド複合体はゲル中をポリペプチドのサイズに依存した移動度で移動する。

生じた SDS—ポリペプチド複合体の電気泳動による移動度は、全ての複合体分子について質量に対して同じ関数関係にあるとみなされる。SDS—複合体は低分子量複合体のほうが高分子量のものより速く陽極に向かって移動すると想定できる。したがって、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法での相対移動度からタンパク質の分子量を推定することができ、またゲル中の他のバンドに対する強さで純度を測定できる。

N—又は O—糖鎖のようにポリペプチド骨格への修飾が生じるものについては、SDS が糖に対してはポリペプチドと同様に結合しないため、タンパク質の見かけの分子量に影響を与える。そのため電荷—質量比は一定にならない。

糖鎖と他の翻訳後修飾の程度により、タンパク質の見かけの分子量はポリペプチド鎖の真の質量を反映しない場合もある。

2.1 還元条件

ポリペプチドのサブユニットと三次元構造は多くの場合 S—S 結合により保持されている。還元条件下での SDS ポリアクリルアミド電気泳動法の目的は、S—S 結合を還元してこの構造を破壊したタンパク質を電気泳動することにある。2—メルカプトエタノール (2-ME) やジチオスレイトール (DTT) で処理してタンパク質を完全に変性、解離させるとポリペプチドの骨格がほどけた状態で SDS との複合化が起きる。このような条件下では、ポリペプチドのサブユニットの分子量は適当な分子量マーカーがあれば直線回帰 (又は厳密には非直線回帰) により求めることができる。

2.2 非還元条件

試験目的によっては、タンパク質をサブユニットへ完全に解離させたくない場合がある。2—メルカプトエタノールや DTT のような還元剤による処理をしなければ、S—S 結合は完全に保持されたままとなり、タンパク質はオリゴマーとして保持される。SDS タンパク質のオリゴマー複合体はそれらの SDS—サブユニット複合体よりも移動速度は遅い。その上、非還元タンパク質は SDS によって完全には飽和されないため、SDS と一定の質量比では結合しない。さらに、鎖内 S—S 結合は通常ストークス径を低下させるようにタンパク質の形状を制約する。そのため見かけの分子量 (M_r) が低下する。このため、完全に還元変性させたポリペプチドの分子量測定に比べて非還元条件下での SDS ポリアクリルアミド電気泳動法による分子量の測定はより複雑である。なぜなら、分子量を正確に比較するには標準物質と試料の双方が類似した形状である必要があるからである。

3. 不連続緩衝液系ゲル電気泳動の特徴

タンパク質の混合物を分析するための最も一般的な電気泳動法は、二種類の異なるゲルを連結させる方法、すなわち、分離（下層）ゲルと濃縮（上層）ゲルからなる不連続な緩衝液系ゲルを用いる方法である。この二種のゲルは孔径、pH 及びイオン強度において異なっている。更に、ゲル中と電解緩衝液で異なる移動イオンが用いられる。緩衝液系の不連続性によって、大容量の試料溶液でも濃縮ゲル中で濃縮され、結果として分離度が高まる。電圧をかけると試料溶液が存在するところで電圧が低下し、これによってタンパク質が濃縮ゲルに導入される。電極緩衝液からグリシンイオンがタンパク質に続いて濃縮ゲル中に入る。移動の速い塩素イオンを先端に、これに比して移動が遅いグリシンイオンを後端とする移動界域が速やかに形成される。この先端イオンと後端イオンの境界面に高電圧が局所的に生じ、SDS-タンパク質複合体は濃縮層を形成し、塩素イオン層及びグリシンイオン層の間を泳動する。添加した試料の層高に関係なく、全ての SDS-タンパク質複合体はごく狭い範囲に濃縮され、極めて限定された高密度タンパク質の層として分離ゲル中に入る。孔径の大きな濃縮ゲルはほとんどのタンパク質の移動は妨げず、主として対流防止物質として働いている。分離ゲルのより小さい孔径とタンパク質の濃縮にも寄与する緩衝液の不連続性により、濃縮ゲルと分離ゲルの境界面でタンパク質の移動速度は急激に低下する。分離ゲル中ではゲルのマトリックスによる分子ふるい効果によってタンパク質の移動速度は低下し続ける。グリシンイオンはタンパク質を追い越し、トリスヒドロメチルアミノメタンとグリシンにより形成された均一な pH 域に移動する。分子ふるい効果により SDS-タンパク質複合体はそれぞれ分子量に従って分離される。

4. 垂直不連続緩衝液系 SDS-ポリアクリルアミドゲルの調製

この項はプレキャストゲルには適用されない。本項では特定の器具を用いたゲルの調製について述べる。プレキャストゲルあるいは市販品については製造業者の使用説明書に従い操作する。

溶液中で精製された市販試薬の使用が推奨される。これ以外の場合及び試薬の純度が十分ではない場合は、前処理を行う。例えば、ろ過が必要な純度が低い溶液も混床（陰イオン/陽イオン交換）レジンでイオンを除去し、アクリル酸と他の荷電した分解物を除く。未開封のガス（アルゴン又は窒素）を注入したアクリルアミド/ビスアクリルアミド溶液とデシケーターあるいはシリカゲルを含む密封容器中で乾燥させた過硫酸塩固体は長期間安定である。過硫酸アンモニウム溶液は用時調製する。

4.1 ゲル形成カセットの組み立て

ガラス板 2 枚（サイズ：例えば 10cm×8cm）、ポリテトラフルオロエチレン製サンプルルーム、スペーサー 2 個、シリコンゴム管（直径：例えば 0.6mm×35cm）をマイルドな洗剤で洗い、水及び無水アルコールで十分にゆすぎ、ガラス板を室温で乾燥させる。注意：タオルや紙で乾燥させると染色される不純物が混入される可能性があるが、空気乾燥はそのリスクを予防する。スペーサー及びシリコンゴム管に非シリコン性グリースを塗る。このスペーサーをガラス板の両短端側に端から 2mm 離し、更にゲルの底部に相当する長端

側の端から 2mm 離れた位置に取り付ける。次の片方のスペーサーに沿ってガラス板にシリコーンゴム管を取り付け始める。注意しながらスペーサーの下部でシリコーンゴム管を曲げてガラス板の長端側に向ける。長端側のシリコーンゴム管を指で押さえながらもう片方の短端側へ曲げて、取り付ける。2枚目のガラス板をきちんと置き、手で押さえる。両短端側を 2 個ずつの留め金で固定する。注意しながらガラス板の長端側を 4 個の留め金で固定してゲル枠の底部を形成させる。シリコーンゴム管がガラス板の端に沿って取り付けられ、留め金で固定した時に押し出されていないことを確認する。これでゲル形成枠にゲルを注ぐことができる。

4.2 ゲルの調製

不連続緩衝液系 SDS-ポリアクリルアミドゲルでは、両ゲルのアクリルアミド-ビスアクリルアミドの組成、緩衝液及び pH が異なるので、分離ゲルを注ぎ、ゲルを形成させた後に濃縮ゲルを注ぐ。

4.2.1 分離ゲルの調製

表 2.2.31.-1 に示した量に従って、目的濃度の分離ゲルを調製するのに必要なアクリルアミドを含むよう溶液適当量を三角フラスコ中で調製する。表に示した順序で組成成分を混和する。過硫酸アンモニウム溶液及び TEMED を加える前に、混和した液を必要に応じてセルロースアセテート膜（孔径：0.45 μm ）を用い吸引ろ過する；ろ過中に気泡が生じなくなるまでろ過装置を振りながら減圧する。表 2.2.31.-1 に従って適量の過硫酸アンモニウム溶液及び TEMED を加え、振り混ぜ、直ちにゲル形成枠の 2 枚のガラス板の間に注ぐ。濃縮ゲルのための十分なスペース（サンプルコームの歯の長さプラス 1cm）を残しておく。この液の上にピペットを用いてイソブタノール飽和水を注意してのせる。これを室温で垂直に放置してゲルを重合させる。

4.2.2 濃縮ゲルの調製

分離ゲルの重合が完了（約 30 分）した後、イソブタノール層を捨て、ゲル上部を水で数回洗ってイソブタノール及び非重合のアクリルアミドを取り除く。ゲルの上部からできる限り水分を流し去り、更に残る水分をペーパータオルの端で取り除く。

表 2.2.31.-2 に示した量に従って、目的に応じた濃度のアクリルアミドを含む溶液の適当量を三角フラスコ中で調製する。示された順序で組成成分を混和する。過硫酸アンモニウム溶液及び TEMED を加える前に、混和した液を必要に応じてセルロースアセテート膜（孔径：0.45 μm ）を用い吸引ろ過する。ろ過中に気泡が生じなくなるまでろ過装置を振りながら減圧する。表 2.2.31.-2 に従って適量の過硫酸アンモニウム溶液及び TEMED を加え、振り混ぜ、直ちにゲル形成枠の 2 枚のガラス板の間にある分離ゲル液中に差し込む。更に濃縮ゲル液をサンプルコームのスペースが完全に満たされるよう加える。これを室温で垂直に放置してゲルを重合させる。

4.3 サンプルの調製

医薬品各条で特に規定するものの他、サンプルは次のように調製する。

サンプル緩衝液（非還元条件）：水と濃縮 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動サンプル緩衝液の等量を混和する。

サンプル緩衝液（還元条件）：水と還元剤として 2-ME（又は DTT）を含む還元条件の濃縮 SDS-ポリアクリルアミド電気泳動サンプル緩衝液を等量混和する。

試験する試料と標準溶液をサンプル緩衝液で希釈し、各条で記載された濃度を得る（タンパク質及び染色法に依存して、濃度は変動する）。

サンプル処理: 5 分間、水浴上又はブロックヒーターを用いて加熱した後、冷やす（タンパク質の切断が熱処理の間に起きる可能性があるため温度及び時間は各条で変動しうることに留意すべきである）。

4.4 電気泳動装置へのゲルの取り付け及び泳動分離

ゲルの重合が完了した後（約 30 分）、サンプルコームを注意して取り除き、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動用緩衝液で溝をゆすぎ、非重合アクリルアミドを除去する。必要ならば、先端を鈍化した皮下注射針で濃縮ゲルの溝をまっすぐに直す。片方の短端側の留め金はずし、注意してシリコーンゴム管を取り除き、再び留め金を付ける。反対側についても同様に操作する。ゲル底部からシリコーンゴムを取り除く。このゲルを泳動装置に取り付け、泳動緩衝液を上部及び下部の緩衝液槽に入れる。ガラス板間のゲル底部の気泡を取り除く。この操作を行うには曲がった注射針を付けた注射筒を用いると良い。緩衝液系の不連続性が壊れるので、試料液などの液を添加する前に予備泳動を行なってはならない。試料などの液を添加する前に SDS-ポリアクリルアミド電気泳動用緩衝液でゲルの溝を注意してゆすぎ、適切な試料用緩衝液を用いて試料液及び標準液を調製し、各条の規定に従って処理する。各々の液の適量を濃縮ゲルの溝に添加する。

各電気泳動装置に適した条件を用いて泳動を開始する。各電気泳動装置に応じた表面積及び厚さの異なるゲルを市販品として入手することもできる。最適に分離を得るためには泳動時間及び電流/電圧は泳動装置により変更する必要がある。分離ゲル中へ色素の先端が移動していることを確認する。色素がゲルの下部に到達したら、泳動を停止する。ゲル部を装置からはずし、注意しながらガラス板を取り除く。スペーサーを取り除き、濃縮ゲルを除去した後、直ちに染色操作に入る。

4.5 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動-濃度勾配ゲル

濃度勾配ゲル（分離ゲル）は先端から下端までアクリルアミドの濃度を増加し調製する。濃度勾配ゲルの調製には濃度勾配を形成する装置が必要となる。すぐに使える濃度勾配ゲルは各電気泳動装置に適した条件で市販品として入手できる。濃度勾配ゲルは固定濃度ゲルを上回る長所がある。固定濃度ゲルと一緒に移動するタンパク質は濃度勾配ゲル内で分離できる。電気泳動の間、孔径の大きさが最大に達し濃縮効果が起きるまで、タンパク質は移動する。その結果、バンドがよりシャープになる。以下の表に示すように、濃度勾配ゲルは固定した濃度ゲルよりも広い範囲の分子量のタンパク質も分離できる。

以下の表は濃度勾配ゲルの組成を示しており、アクリルアミドの濃度範囲と分離に適し

たタンパク質の分子量は関連している。他の濃度勾配形状（例えば、くぼんだ形状）は特別な使用目的で調製することに注意する。

アクリルアミド (%)	タンパク質範囲 (kDa)
5-15	20-250
5-20	10-200
10-20	10-150
8-20	8-150

濃度勾配ゲルは分子量及びタンパク質の純度の測定にも使用する。

4.6 ゲル中のタンパク質の検出

クーマシー染色と銀染色は最も一般的な染色方法であり以下により詳細に述べる。様々な市販の染色、検出方法及び市販のキットが入手できる。例えば、蛍光染色は蛍光イメージャーを用いて可視化され、広い範囲のタンパク質濃度で直線的な反応を通常得ることができ、その直線的な反応性はタンパク質に依存しており通常数桁である。

クーマシー染色はバンド当たり約 1~10 μ g のタンパク質量が検出できる。銀染色はゲル中の染色タンパク質の最も高感度な方法であり、10~100ng のタンパク質を含むバンドを検出できる。これらの感度は安定して得ることができると考えられる。両染色において感度を一桁又は二桁改善させてタンパク質を検出している例が文献で報告されている。

クーマシー染色は銀染色よりも直線性が高い。しかし、直線性が得られる範囲はタンパク質と染色時間に依存する。例えば、主観的に染色が十分と判断し染色を途中で中止する場合は、クーマシー及び銀染色の感度の再現性が悪くなる。ダイナミックレンジが幅広い標準タンパク質を使用することは、室内実験感度及び直線性の評価に役立つため、非常に重要である。ゲル染色は全て手袋を用い適切な容器中で例えばオービタルシェーカーを用いて静かに振り混ぜながら室温で行う。

4.6.1 クーマシー染色

十分な量のクーマシー染色試液中にゲルを浸し、少なくとも 1 時間染色する。染色試液を取り除く。

十分な量の脱色試液でゲルを脱色する。染色されたタンパク質のバンドが透明な背景に明瞭に区別できるようになるまで脱色試液を数回交換する。ゲルの脱色が進めば進むほど、より少ないタンパク質量を検出できるようになる。2~3g の陰イオン交換樹脂若しくは少量のスポンジ片を脱色試液に入れると脱色を早めることができる。

注：この操作で用いられる酸-アルコール液はゲル中のタンパク質を完全には固定しない。したがってゲルの染色及び脱色の操作中に分子量の低いタンパク質は多少とも失われることがある。クーマシー染色試液中に浸す前にゲルをトリクロロ酢酸/メタノール/水混液 (1:4:5) に 1 時間浸すことにより耐久性の固定が得られる。

4.6.2 銀染色

ゲルを十分な量の固定試液に浸し、1時間放置する。固定試液を除去し、新しい固定試液を加え、少なくとも1時間又は可能なら一夜放置する。固定試液を捨て、ゲルを過剰の水中で1時間洗う。ゲルを1vol%のグルタルアルデヒド溶液中に15分間浸し、過剰の水中で2回15分ずつ洗う。次に暗所で新鮮な銀染色用硝酸銀試液中に15分間浸した後、5分間ずつ3回過剰の水で洗う。十分に染色されるまで現像試液中に約1分間ゲルを浸し、更に停止試液中で15分間放置して現像する。ゲルを水で洗う。

4.7 結果の記録

ゲルを濡れたまま又は適切な乾燥操作により乾燥後、写真を撮るかスキャンする。濡れたゲルの写真を直ちに撮影し解析を行うため、最近、データ解析ソフトウェアを備えたゲルスキャニングシステムが市販で入手できる。染色したSDSポリアクリルアミドゲルの乾燥は恒久的に記録として残すための方法の1つである。この方法はセルロースフィルムの間で乾燥させる間に亀裂が起きる頻度が高く、後でデンストメトリー解析に適さなくなる。

用いる染色方法に依存して、ゲルの前処理法は若干異なる。クーマシー染色の場合では、脱色後少なくとも2時間又は可能なら一晩100 g/Lのグリセリン溶液中にゲルを放置する。

銀染色の場合では、20 g/Lのグリセリン溶液中に5分間浸す。

次に多孔性のセルロースフィルム2枚を水に浸し、5~10分放置する。一方のシートを乾燥用枠にのせる。注意してゲルを取り上げ、そのフィルム上に置く。気泡を取り除き、ゲルの周囲に2~3mLの水を注ぎ、その上にもう1枚のフィルムをのせ、気泡を取り除く。乾燥用枠を組み立て、オープン中又は室温で乾燥するまで放置する。

4.8 分子量の測定

タンパク質の分子量はそれぞれの移動度を分子量既知のいくつかのマーカータンパク質のそれと比較して算出する。一様に染色されるように混和された分子量既知の予め染色されたタンパク質及び染色されていないタンパク質の混合液がゲルのキャリブレーション用に市販されている。各種の分子量範囲のものが入手できる。分子量既知のマーカータンパク質の高濃度ストック溶液を適当な試料緩衝液で希釈し、測定しようとするタンパク質試料と同一のゲルに添加する。

泳動の完了後、直ちに泳動イオンの先端を確認するためトラッキング色素であるプロモフェノールブルーの位置に印を付ける。これにはゲルの端に切り込みを入れる、又はは墨汁に浸した針でゲルを刺すという方法がある。染色後、各タンパク質のバンド（マーカータンパク質及び試料）について分離ゲルの上端からの移動距離を測定する。各タンパク質の移動距離をトラッキング色素の移動距離で割る。このようにして得られた移動距離はタンパク質の（色素の先端に対する）相対移動度又は R_F と呼ばれる。マーカータンパク質の相対分子量(M_r)の対数を R_F 値に対してプロットする。未知のタンパク質の分子量は直線回帰分析（より正確には非直線回帰分析）によって、又は未知試料で得られた相対移動度がほぼグラフの直線部分に位置する場合には R_F に対する M_r の対数曲線に内挿することによって推定することができる。

4.9 実施した試験の適合性（バリデーション）

分子量マーカーが、ゲルの長さの 80%以内に分布し、また、必要とされる分離範囲（例えば、目的物質とその二量体又は目的物質とその類縁物質をカバーする範囲）にわたって分布する場合以外、試験は無効である。予測されるタンパク質で得られた分離は、分子量の対数値と R_F をプロットするとき直線関係を示す必要がある。プロットがシグモイドの形状を有する場合は、カーブの直線領域からのデータのみ分子量の計算に用いることができる。試験サンプルについての更にバリデーションを行う必要性は各条で規定する。

感度もバリデーションを評価する必要がある。試験サンプルと並行して泳動する望ましい濃度限界に相当する標準タンパク質コントロールは実験のシステム適合性に用いることができる。

4.10 不純物の定量

デンシトメーターによる吸光度の積算あるいはイメージ分析を用い主バンドに対する相対的な濃度を測定することにより不純物を定量する場合、反応は直線性が適合する必要がある。“ゲル中のタンパク質の検出”の項目の紹介で記載したように、検出方法及びタンパク質に依存して、直線性のある範囲は変動するが、適当な範囲のタンパク質濃度を含む 1 つ以上のコントロールサンプルを用いた各泳動内で評価できる。

各条に不純物の存在許容限度が規定されている場合は、試験溶液を希釈して不純物の限度規格値に相当する標準溶液を調製する。例えば、限度規格値が 5% なら、標準溶液は試験溶液を 20 倍に希釈したものになる。試料溶液から得た不純物のバンドは標準溶液から得た主バンドより濃くない。

バリデートされた条件下では、デンシトメーターによる吸光度の積算あるいはイメージ分析を用いて主バンドに対して相対的な濃度を測定することにより不純物を定量できる。

5. 試薬・試液

- (i) 30% アクリルアミド/ビスアクリルアミド(29:1)試液：アクリルアミド 290g 及びメチレンビスアクリルアミド 10g を水に溶かし、1 L とし、ろ過する。
- (ii) 1.5 M トリス塩酸試液 pH8.8：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン 90.8mg に水 400mL を加えて溶かす。塩酸を加えて pH を 8.8 に調整した後、水を加えて 500mL とする。
- (iii) SDS ポリアクリルアミド電気泳動サンプル緩衝試液（高濃度）：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン 1.89g, ラウリル硫酸ナトリウム 5.0g 及びブロモフェノールブルー 50mg を水に溶かす。グリセリン 25.0mL を加え、水を加えて 100mL とする。塩酸を加えて pH を 6.8 に調整した後、水を加えて 125mL とする。
- (iv) 還元条件の SDS ポリアクリルアミド電気泳動サンプル緩衝試液（高濃度）：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン 3.78g, ドデシル硫酸ナトリウム 10.0g 及びブロモフェノールブルー 100mg を水に溶かす。グリセリン 50.0mL を加え、水を加えて 200mL とする。2-メルカプトエタノール 25.0mL を加える。塩酸を加えて pH を 6.8 に調整した後、水を加

えて 250mL とする。あるいは、2-メルカプトエタノールの代りに還元剤としてジチオスレイトールを用いる。この場合次のようにサンプル緩衝試液を調製する。トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン 3.78g, ドデシル硫酸ナトリウム 10.0g 及びビブロモフェノールブルー100mg を水に溶かす。グリセリン 50.0mL を加え、水を加えて 200mL とする。塩酸を加えて pH を 6.8 に調整した後、水を加えて 250mL とする。使用する直前にジチオスレイトールを最終濃度が 100mM になるよう加える。

(v) SDS ポリアクリルアミド電気泳動泳動緩衝試液：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン 151.4g, グリシン 721.0g 及びラウリル硫酸ナトリウム 50.0g を水に溶かして 5000mL とする。使用直前に水を加えて 10 倍に希釈する。希釈溶液の pH を測定する。pH は 8.1 と 8.8 の間である。

(vi) クーマシー染色試液：アシッドブルー83 1.25g を水／メタノール／酢酸(100)混液 (5:4:1)1L に溶かし、ろ過する。

(vii) 脱色試液：水／メタノール／酢酸(100)混液(5:4:1)

(viii) 固定試液：メタノール 250mL にホルムアルデヒド 0.27mL 及び水を加えて 500mL とする。

(ix) 硝酸銀試液：水酸化ナトリウム試液 40mL にアンモニア水(28)3mL を加え、更にかき混ぜながら硝酸銀溶液(1→5)8mL を滴下する。次に水を加えて 200mL とする。

(x) 現像試液：クエン酸一水和物 2g を水に溶かし、100mL とする。この液 2.5mL にホルムアルデヒド 0.27mL 及び水を加えて 500.0mL とする。

(xi) 停止試液：水／酢酸 (100) 混液 (9:1)

表2.2.31-1 分離ゲルの調製

溶液の組成		各溶液の容量(mL)/ゲル容量							
		5mL	10mL	15mL	20mL	25mL	30mL	40mL	50mL
6 % ア ク リ ル ア ミ ド	水	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
	アクリルアミド溶液 ^{*1}	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
	1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100g/L APS ^{*4}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ^{*5}	0.004	0.008	0.012	0.016	0.02	0.024	0.032	0.04
8 % ア ク リ ル ア ミ ド	水	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
	アクリルアミド溶液 ^{*1}	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
	1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100g/L APS ^{*4}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ^{*5}	0.003	0.006	0.009	0.012	0.015	0.018	0.024	0.03
10 % ア ク リ ル ア ミ ド	水	1.9	4.0	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
	アクリルアミド溶液 ^{*1}	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
	1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100g/L APS ^{*4}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ^{*5}	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
12 % ア ク リ ル ア ミ ド	水	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
	アクリルアミド溶液 ^{*1}	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
	1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100g/L APS ^{*4}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ^{*5}	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
14 % ア ク リ ル ア ミ ド	水	1.4	2.7	3.9	5.3	6.6	8.0	10.6	13.8
	アクリルアミド溶液 ^{*1}	2.3	4.6	7.0	9.3	11.6	13.9	18.6	23.2
	1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8) ^{*2}	1.2	2.5	3.6	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100g/L APS ^{*4}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ^{*5}	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02
15 % ア ク リ ル ア ミ ド	水	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5
	アクリルアミド溶液 ^{*1}	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
	1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100g/L APS ^{*4}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	TEMED ^{*5}	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01	0.012	0.016	0.02

*1 アクリルアミド溶液：30%アクリルアミド/ビスアクリルアミド(29：1)溶液

*2 1.5mol/Lトリス溶液(pH8.8)：1.5mol/Lトリス塩酸塩緩衝液，pH8.8

*3 100g/L SDS：100g/Lドデシル硫酸ナトリウム溶液

*4 100g/L APS：100g/L過硫酸アンモニウム溶液。過硫酸アンモニウムはフリーラジカルを生成してアクリルアミドとビスアクリルアミドの重合を促す。過硫酸アンモニウムは次第に分解するので、溶液は用時調製すること。

*5 TEMED：N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン

表2.2.31-2 濃縮ゲルの調製

溶液の組成	各溶液の容量(mL)/ゲル容量							
	1mL	2mL	3mL	4mL	5mL	6mL	8mL	10mL
水	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
アクリルアミド溶液 ^{*1}	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1.0	1.3	1.7
1.0mol/Lトリス溶液(pH6.8) ^{*2}	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
100g/L SDS ^{*3}	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
100g/L APS ^{*4}	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED ^{*5}	0.001	0.002	0.003	0.004	0.005	0.006	0.008	0.01

*1 アクリルアミド溶液 : 30%アクリルアミド/ビスアクリルアミド(29 : 1)溶液

*2 1.0mol/Lトリス溶液(pH6.8) : 1mol/Lトリス塩酸塩緩衝液, pH6.8

*3 100g/L SDS : 100g/Lドデシル硫酸ナトリウム溶液

*4 100g/L APS : 100g/L過硫酸アンモニウム溶液. 過硫酸アンモニウムはフリーラジカルを生成してアクリルアミドとビスアクリルアミドの重合を促す. 過硫酸アンモニウムは次第に分解するので, 溶液は用時調製すること.

*5 TEMED : *N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン