

1 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法

2 次のように改める。

3 本試験法は、三業局方での調和合意に基づき規定した試験法である。

4 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
5 ク質の特性解析、及び純度試験や定量試験に用いられる。

6 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
7 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
8 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
9 常的に用いられる。

10 既製のゲル(プレキャストゲル)及び試薬類が市販されている
11 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
12 っ、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、
13 以下の方法に代えて利用して差し支えない。

14 1. ポリアクリルアミドゲルの特性

15 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
16 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
17 形成される繊維と孔の三次元網目構造により得られる。通常、
18 この重合反応は、過硫酸アンモニウム及び*N,N,N',N'*-テ
19 ラメチルエチレンジアミン(TEMED)によるフリーラジカル生
20 成系により触媒される。

21 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。
22 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。
23 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。

24 利用できるアクリルアミドゲル濃度には限界がある。アクリル
25 アミド濃度が高い場合、ゲルが壊れやすく、取扱いが難しい。

26 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
27 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
28 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
29 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
30 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。

31 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
32 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、
33 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。

34 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
35 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。

36 2. 変性条件下ポリアクリルアミドゲル電気泳動

37 以下に例示する方法は、質量14000~100000ダルトンの単
38 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
39 術(例えば濃度勾配(グラジエント)ゲル、特殊な緩衝液系)によ
40 ってこの質量範囲を広げることが可能である。例えば、電気泳
41 動用緩衝液の後端イオンとして以下の方法で使用されるグリシ
42 ンの代わりにトリシンを用いるトリシンドデシル硫酸ナトリウ
43 ム(SDS)ゲルは、10000~15000ダルトン以下の非常に小さな
44 タンパク質及びペプチドを分離できる。

45 グリシンSDSを用いる変性条件下のポリアクリルアミドゲ
46 ル電気泳動法(SDS-PAGE)は、タンパク質性生物薬品の品質
47 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
48 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
49 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
50 トに分離させ、また凝集を最小にするような条件にしたポリア
51 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

52 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
53 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
54 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。
55 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
56 例しており、そのアミノ酸配列に依存しないため、SDS-ポリ
57 ペプチド複合体はゲル中をポリペプチドの大きさに依存して
58 移動する。

59 生じたSDS-ポリペプチド複合体の電気泳動による移動度
60 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
61 るとみなされる。SDS-複合体は低分子量複合体のほうが高
62 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。

63 したがって、SDS-PAGEでの相対移動度からタンパク質の分
64 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
65 強さで純度を測定できる。

66 N結合型糖鎖やO結合型糖鎖のようにポリペプチド骨格への
67 修飾が生じるものについては、SDSが糖鎖に対してポリペプ
68 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
69 影響を与える。そのため、電荷-質量比は一定にならない。

70 糖鎖修飾や他の翻訳後修飾の程度により、タンパク質の見か
71 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
72 る。

73 2.1. 還元条件

74 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
75 結合により保持されている。還元条件下でのSDS-PAGEの
76 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
77 を電気泳動することにある。2-メルカプトエタノール(2-
78 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
79 に変性、解離させるとポリペプチドの骨格がほどこけた状態
80 SDSとの複合化が起きる。このような条件下では、ポリペプ
81 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
82 線形回帰(又はより厳密には非線形回帰)により求めることが
83 できる。

84 2.2. 非還元条件

85 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
86 離させたくない場合がある。2-MEやDTTのような還元剤に
87 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
88 なり、タンパク質はオリゴマーとして保持される。SDS-タン
89 パク質オリゴマー複合体はそれらのSDS-サブユニット複
90 合体よりも移動速度は遅い。その上、非還元タンパク質は
91 SDSによって完全には飽和されないため、SDSと一定の質量
92 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
93 径を低下させるようにタンパク質の形状を制約するため、見か
94 けの分子量(M_v)が低下する。このため、完全に還元変性させた
95 ポリペプチドの分析に比べ、非還元条件下でのSDS-PAGEによ
96 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
97 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
98 があるからである。

99 3. 不連続緩衝液系ゲル電気泳動の特徴

100 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
101 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
102 (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
103 用いる方法である。この二種類のゲルは、孔径、pH及びイオン
104 強度において異なっている。さらに、ゲル中と電解緩衝液で
105 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、

106 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
107 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
108 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。
109 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
110 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
111 が遅いグリシンイオンを後端とする移動領域が速やかに形成さ
112 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
113 に生じ、SDS-タンパク質複合体は濃縮層を形成し、塩素イ
114 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
115 層高に関係なく、全てのSDS-タンパク質複合体はごく狭い
116 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
117 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
118 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
119 いる。濃縮ゲルと分離ゲルの境界面では、分離ゲルの孔径の制
120 限と緩衝液の不連続性により、タンパク質の移動度が急速に減
121 少し、これがタンパク質の濃縮に寄与する。分離ゲル中では、
122 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
123 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
124 い越し、2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジ
125 オールとグリシンにより形成された均一なpH域に移動する。
126 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
127 子量に従って分離される。

128 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

129 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。本
130 法はプレキャストゲルには適用しない。プレキャストゲル又は
131 市販の機材を用いる場合、製造業者の取扱説明書に従わなけ
132 ればならない。

133 溶液として精製された市販試薬の使用が推奨される。これ以
134 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。
135 例えば、ろ過が必要な純度が低い溶液では混床(陰イオン/陽
136 イオン交換)樹脂を用いて、アクリル酸や他の荷電した分解物
137 を除かねばならない。アクリルアミド/ビスアクリルアミド溶
138 液や固体の過硫酸塩は、推奨条件で保管すれば、長期間安定で
139 ある。

140 4.1. ゲル形成力セットの組立て

141 ガラス板2枚(サイズ:例えば10 cm×8 cm)、ポリテトラフ
142 ルオロエチレン製サンプルコーム、スペーサー2個及びシリコ
143 ーンゴム管(直径:例えば0.6 mm×35 cm)をマイルドな洗剤で
144 洗い、水及び無水アルコールで十分にすすぎ、室温で乾燥させ
145 る。スペーサー及びシリコーンゴム管に非シリコーン性グリー
146 スを塗布する。このスペーサーをガラス板の両短端側に端から
147 2 mm離し、さらにゲルの底部に相当する長端側の端から2
148 mm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
149 ガラス板にシリコーンゴム管を取り付ける。注意しながらスペ
150 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
151 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
152 方の短端側へ曲げて、取り付ける。2枚目のガラス板を正確に
153 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。
154 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
155 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
156 って取り付けられ、留め金で固定したときに押し出されていな
157 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
158 る。

159 4.2. ゲルの調製

160 不連続緩衝液系SDS-ポリアクリルアミドゲルでは、両ゲ
161 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
162 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
163 縮ゲルを注ぐ。

164 4.2.1. 分離ゲルの調製

165 表1に示した量に従って、目的に応じた濃度の分離ゲルを調
166 製するのに必要なアクリルアミドを含む溶液適量を三角フラ
167 スコ中で調製する。表1に示した順序で組成成分を混和する。過
168 硫酸アンモニウム溶液及びTEMEDを加える前に、混和した液
169 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
170 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
171 振りながら減圧する。表1に従って適量の過硫酸アンモニウム
172 溶液及びTEMEDを加え、振り混ぜ、直ちにゲル形成枠の2枚
173 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
174 ンプルコームの歯の長さプラス1 cm)を残しておく。この液の
175 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積層さ
176 せる。これを室温で垂直に放置してゲルを重合させる。

177 4.2.2. 濃縮ゲルの調製

178 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
179 捨て、ゲル上部を水で数回洗浄し、イソブタノール及び非重合
180 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を
181 流し去り、さらに残る水をペーパータオルの端で取り除く。

182 表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
183 ドを含む溶液適量を三角フラスコ中で調製する。表2に示し
184 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
185 TEMEDを加える前に、混和した液を必要に応じてセルロース
186 アセテート膜(孔径:0.45 µm)を用い吸引ろ過する。ろ過中に
187 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
188 に従って適量の過硫酸アンモニウム溶液及びTEMEDを加え、
189 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
190 ゲルの上に直接注ぐ。直ちに気泡が入らぬように注意しながら
191 清浄なサンプルコームを濃縮ゲル液中に差し込む。さらに濃縮
192 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
193 える。これを室温で垂直に放置してゲルを重合させる。

194 4.3. 試料の調製

195 医薬品各条で特に規定するもののほか、試料は次のように調
196 製する。

197 試料溶液(非還元条件): 試料溶液又は標準溶液とSDS-
198 PAGE試料緩衝液(高濃度)の等量混合液。

199 試料溶液(還元条件): 試料溶液又は標準溶液と還元剤として
200 2-ME(又はDTT)を添加した還元条件用SDS-PAGE試料緩衝
201 液(高濃度)の等量混合液。

202 各条においては、各タンパク質や染色方法に従って、タンパ
203 ク質濃度を規定して良い。

204 試料処理: 沸騰水浴又は100 °Cに設定したブロックヒーター
205 を用いて5分間加熱した後、冷却する(タンパク質の切断が熱処
206 理の間に生じる可能性があるため、温度及び時間は各条で適宜
207 設定しても良い)。

208 4.4. 電気泳動装置へのゲルの取付け及び泳動分離

209 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
210 て取り除き、SDS-PAGE泳動緩衝液で溝をすすぎ、非重合ア
211 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
212 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

213 をはずし、注意してシリコーンゴム管を取り除き、再び留め金
214 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
215 リコーンゴム管を取り除く。このゲルを泳動装置に取り付け、
216 SDS-PAGE泳動緩衝液を上部及び下部の緩衝液槽に入れる。
217 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
218 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
219 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
220 を行ってはならない。試料などの液を添加する前にSDS-
221 PAGE泳動緩衝液でゲルの溝を注意してすすぐ。適切な試料用
222 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
223 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
224 気泳動装置に適した条件で泳動を開始する。各電気泳動装置に
225 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
226 ともできる。最適な分離を得るためには泳動時間及び電流/電
227 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
228 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
229 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
230 がらガラス板を取り除く。スパーサーを取り除き、濃縮ゲルを
231 除去した後、直ちに染色操作に入る。

232 4.5. SDS-PAGE-グラジエントゲル

233 グラジエントゲル(分離ゲル)は、先端から下端に向かって、
234 アクリルアミドの濃度を増加して調製されたものである。グラ
235 ジエントゲルの調製にはグラジエントを形成する装置が必要と
236 なる。市販されているプレキャストグラジエントゲルは各製品
237 の推奨条件下で利用できる。グラジエントゲルは固定濃度ゲル
238 と比べ、いくつかの長所がある。固定濃度ゲルと同様の移動度
239 を示すタンパク質であっても、グラジエントゲルで分離できる
240 ことがある。電気泳動の間、タンパク質は孔径による阻害が生
241 じ濃縮効果が起きるまで移動するため、シャープなバンドにな
242 る。以下の表に示すように、グラジエントゲルは固定した濃度
243 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。

244 以下の表は、アクリルアミドの濃度範囲と分離に適したタン
245 パク質の分子量の範囲について示している。特定の使用目的の
246 ためには、他のグラジエント形状(例えば、凹型勾配)も調製で
247 きる。

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

248 グラジエントゲルは分子量及びタンパク質の純度の測定にも
249 使用される。

250 4.6. ゲル中のタンパク質の検出

251 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
252 下により詳細に述べる。それ以外にも様々な市販の染色、検出
253 方法及び市販のキットが利用できる。例えば、蛍光染色は蛍光
254 イメージャーを用いて可視化され、通常広い範囲のタンパク質
255 濃度で直線的な反応を得ることができ、その範囲はタンパク質
256 に依存しており、通常数桁である。

257 クーマシー染色は、バンド当たり約1~10 µgのタンパク質
258 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
259 な方法であり、バンド当たり10~100 ngのタンパク質を検出
260 できる。これらの染色法では、概ねその程度の検出が可能であ

261 るが、一桁又は二桁感度を改善した事例も報告されている。

262 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
263 性が得られる範囲はタンパク質と染色時間に依存する。主観に
264 よって染色操作を停止した場合、クーマシー及び銀染色の感度
265 の再現性が悪くなることもある。ダイナミックレンジが広い標
266 準タンパク質を使用することは、同一実験内の感度及び直線性
267 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
268 を着用し、適切な容器を用い、例えばオービタルシェーカーを
269 用いて穏やかに振盪しながら室温で行う。

270 4.6.1. クーマシー染色

271 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
272 1時間染色する。染色試液を取り除く。

273 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
274 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
275 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
276 ないタンパク質量を検出できるようになる。2~3 gの陰イオン
277 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
278 を早めることができる。

279 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
280 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
281 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。
282 クーマシー染色試液中に浸す前にゲルを水/メタノール/トリ
283 クロロ酢酸混液(5:4:1)に1時間浸すことにより耐久性の固定
284 が得られる。

285 4.6.2. 銀染色

286 ゲルを十分量の固定試液に1時間浸漬する。固定試液を除去
287 し、新しい固定試液を加え、少なくとも1時間又は一夜放置す
288 る。固定試液を捨て、十分量の水で1時間洗浄する。1 vol%の
289 グルタルアルデヒド溶液に15分間浸漬し、十分量の水で15分
290 間、2回洗浄する。暗所で新鮮な銀染色用硝酸銀試液に15分間
291 浸漬し、十分量の水で5分間、3回洗浄する。約1分間、十分に
292 染色されるまで現像試液に浸漬する。停止試液に15分間浸漬
293 し、現像を停止させ、水で洗浄する。

294 4.7. 結果の記録

295 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
296 撮るかスキャンする。最近では、データ解析ソフトウェアを備
297 えたゲルスキャニングシステムが市販で入手でき、濡れたゲル
298 の写真を直ちに撮影し解析することができる。

299 用いた染色方法に応じて、ゲルの処理方法は若干異なる。ク
300 ーマシー染色の場合は、脱色後、少なくとも2時間100 g/Lのグ
301 リセリン溶液にゲルを浸漬する(一夜放置しても良い)。

302 銀染色の場合では、20 g/Lのグリセリン溶液中に5分間浸漬
303 する。

304 染色したSDSポリアクリルアミドゲルの乾燥は、恒久的に
305 ゲルを保存する一つの方法である。この方法はセルロースフィ
306 ルムの間で乾燥させる間にゲルに亀裂が生じる頻度が高い。

307 多孔性のセルロースフィルム2枚を水に浸し、5~10分間放
308 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
309 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
310 に2~3 mLの水を注ぎ、その上にもう1枚のフィルムをのせ、
311 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
312 乾燥するまで放置する。

313 4.8 分子量の測定

314 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

315 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
316 染色されるように混和された分子量既知の既染色又は未染色タン
317 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
318 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
319 ーカータンパク質の高濃度ストック溶液を適切な試料緩衝液で
320 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
321 する。

322 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
323 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
324 る。これにはゲルの端に切り込みを入れる、又は墨汁に浸した
325 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
326 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
327 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
328 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
329 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
330 れる。マーカータンパク質の相対分子量(M)の対数を R_f 値に対
331 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
332 (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
333 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
334 R_f に対する M の対数曲線に内挿することによって推定するこ
335 とができる。

336 4.9. 実施した試験の適合性(バリデーション)

337 目的とする分離範囲が適切な分子量マーカーの分布によって
338 示される(例えば、分子量マーカーの分布が、ゲル長の80%に
339 わたる)場合以外は、試験は無効である。予測されるタンパク
340 質で得られた分離は、分子量の対数値と R_f 値をプロットする
341 とき、直線関係を示す必要がある。プロットがシグモイド形状
342 となる場合は、カーブの直線領域に含まれるデータのみ分子量
343 の計算に用いることができる。試験試料について、追加のバリ
344 デーション要件は、各条で規定する。

345 感度についてもバリデーションを行う必要がある。試験試料
346 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
347 質コントロールは、システム適合性試験に用いることができる。

348 4.10 不純物の定量

349 SDS-PAGEは、不純物の限度試験として良く用いられる。
350 デンシトメーター又は画像解析により主バンドに対する不純物
351 の相対量を定量する場合、直線性に関するバリデーションが必要
352 である。“ゲル中のタンパク質の検出”の項目の序文に記載
353 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
354 る範囲は変動するが、適切な範囲のタンパク質濃度を含む一つ
355 以上のコントロール試料を用いることで、各泳動ごとに評価で
356 きる。

357 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
358 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
359 する。例えば、限度規格値が5%なら、標準溶液は試験溶液を
360 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
361 ドは標準溶液から得た主バンドより濃くない。

362 バリデートされた条件下では、デンシトメーター又は画像解
363 析により、主バンドに対して相対的な濃度を測定することによ
364 り不純物を定量できる。

365 5. 試薬・試液

366 (i) 30%アクリルアミド/ビスアクリルアミド(29:1)試
367 液:アクリルアミド290g及びメチレンビスアクリルアミド10
368 gを水に溶かし、1000mLとし、ろ過する。

369 (ii) SDS-PAGE泳動緩衝液:2-アミノ-2-ヒドロキシメ
370 チル-1,3-プロパンジオール151.4g,グリシン721.0g及び
371 ラウリル硫酸ナトリウム50.0gを水に溶かして5000mLとする。
372 使用前に水を加えて10倍に希釈する。希釈溶液のpHを測定
373 するときpHは8.1~8.8である。

374 (iii) SDS-PAGE試料緩衝液(高濃度):2-アミノ-2-ヒド
375 ロキシメチル-1,3-プロパンジオール1.89g,ラウリル硫酸
376 ナトリウム5.0g及びプロモフェノールブルー50mgを水に溶
377 かす。グリセリン25.0mLを加え、水を加えて100mLとする。
378 塩酸を加えてpH 6.8に調整した後、水を加えて125mLとする。

379 (iv) SDS-PAGE試料緩衝液(高濃度),還元条件用:2-アミ
380 ノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール3.78g,ド
381 デシル硫酸ナトリウム10.0g及びプロモフェノールブルー100
382 mgを水に溶かす。グリセリン50.0mLを加え、水を加えて200
383 mLとする。この液に2-ME 25.0mLを加え、塩酸を加えて
384 pH6.8に調整した後、水を加えて250mLとする。又は2-アミ
385 ノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール3.78g,ド
386 デシル硫酸ナトリウム10.0g及びプロモフェノールブルー100
387 mgを水に溶かす。グリセリン50.0mLを加え、水を加えて200
388 mLとする。塩酸を加えてpH 6.8に調整した後、水を加えて
389 250mLとする。使用する直前にDTTを最終濃度が100mMに
390 なるよう加える。

391 (v) クーマシー染色試液:アシッドブルー83 1.25gを水/メ
392 タノール/酢酸(100)混液(5:4:1)1000mLに溶かし、ろ過
393 する。

394 (vi) 現像試液:クエン酸一水和物2gを水に溶かし、100mL
395 とする。この液2.5mLにホルムアルデヒド0.27mL及び水を
396 加えて500mLとする。

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

399 (viii) 硝酸銀試液,銀染色用:水酸化ナトリウム試液40mLに
400 アンモニア水(28)3mLを加え、さらにかき混ぜながら硝酸銀
401 溶液(1→5)8mLを滴加する。次に水を加えて200mLとする。

402 (ix) 脱色試液:水/メタノール/酢酸(100)混液(5:4:1)

403 (x) 1.5mol/Lトリス塩酸試液,pH 8.8:2-アミノ-2-ヒ
404 ドロキシメチル-1,3-プロパンジオール90.8mgを水400mL
405 に溶かし、塩酸を加えてpH 8.8に調整した後、水を加えて500
406 mLとする。

407 (xi) 停止試液:水/酢酸(100)混液(9:1)

408

表1 分離ゲルの調製

溶液の組成		各溶液の容量(mL)/ゲル容量							
		5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
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
	1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100 g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100 g/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
	1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100 g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100 g/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
	1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100 g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100 g/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
	1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100 g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100 g/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
	1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8) ^{*2}	1.2	2.5	3.6	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100 g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100 g/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
	1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8) ^{*2}	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
	100 g/L SDS ^{*3}	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
	100 g/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)試液

*2 1.5 mol/L トリス溶液(pH 8.8)：1.5 mol/L トリス塩酸塩試液，pH 8.8

*3 100 g/L SDS：100 g/L ドデシル硫酸ナトリウム溶液

*4 100 g/L APS：100 g/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 濃縮ゲルの調製

溶液の組成	各溶液の容量(mL)/ゲル容量							
	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
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
1.0 mol/L トリス溶液(pH 6.8) ^{*2}	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1.0	1.25
100 g/L SDS ^{*3}	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
100 g/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)試液

*2 1.0 mol/L トリス溶液(pH 6.8)：1 mol/L トリス塩酸塩試液，pH 6.8

-
- *3 100 g/L SDS : 100 g/Lドデシル硫酸ナトリウム溶液
 - *4 100 g/L APS : 100 g/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