

SDS page

調整する試薬

必要な試薬

アクリルアミド

N, N' メチレン ビス (アクリルアミド)

SDS

Tris

NaCl

KCl

グリシン

メタノール

APS (ペルオキシ 2 硫酸アンモニウム)

TEMED (N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン)

PBS

β メルカプトエタノール、もしくは
bond breaker

Wako クイックCBB

スキムミルク westernのみ

10 % SDS

SDS	50 g
Dw	up to 500 ml

pH 8.8 Tris-HCl 1.5 M

Tris	90.9 g
Dw	400 ml くらい
1 mol/L HClでpH 8.8に調整	
Dw	up to 500 ml

pH 6.8 Tris-HCl 0.5 M

Tris	12.1 g
Dw	100 ml くらい
1 mol/L HClでpH 6.8に調整	
Dw	up to 200 ml

40 % アクリルアミド

神経毒なので取り扱い注意!

アクリルアミド	190 g (38 %)
N, N' メチレン ビス (アクリルアミド)	10 g (2 %)

Dw	up to 500 ml
----	--------------

濃縮ゲル

pH 6.8 Tris-HCl 0.5 M	5 ml
10 % SDS	200 ul
40 % アクリルアミド	2 ml
Dw	13 ml
<hr/>	
	20 ml

分離ゲル

10 %	12 %
pH 8.8 Tris-HCl 1.5 M	10 ml
10 % SDS	400 ul
40 % アクリルアミド	10 ml
Dw	20 ml
<hr/>	
	40 ml

サンプルバッファー

pH 6.8 Tris-HCl 0.5 M	1 ml
10 % SDS	400 ul
グリセロール	800 ul
ブロモフェノールブルー (BPB)	0.04 g
Dw	5.8 ml
<hr/>	
	8 ml

TBS buffer

Westernのみ

final

Tris	6.057 g	50 mM
NaCl	8.06 g	138 mM
KCl	0.2 g	2.7 mM
Dw	800 mlくらい	

1 mol/L HClでpH 7.8-7.9に調整

Dw up to 1L

Transfer buffer

Westernのみ

Tris	5.8 g
グリシン	2.9 g
MeOH	200 ml
Dw	up to 1L

pH 9.0-9.4になる

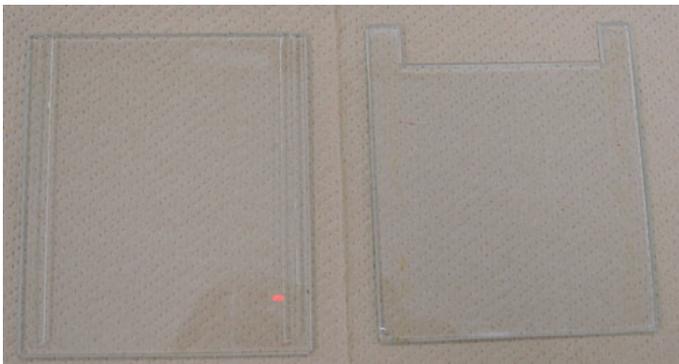
10xSDS PAGE buffer

Tris	15 g
グリシン	72 g
SDS	5 g
Dw	up to 500 ml

固定液

メタノール	500 ml
酢酸	100 ml
Dw	up to 1 L

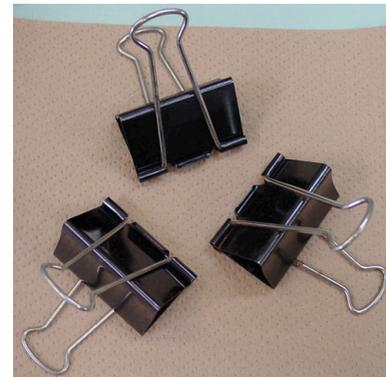
必要なもの



ゲル板



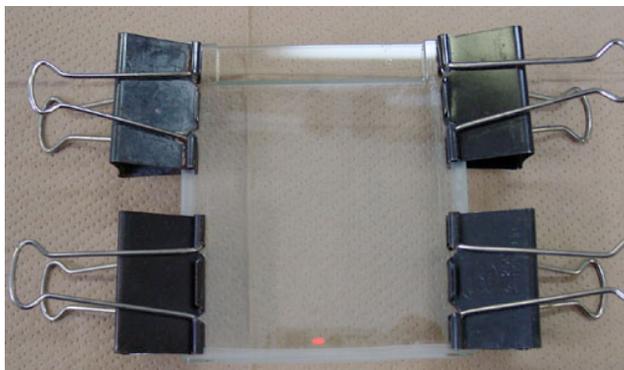
コームとシリコンパッキン



クリップ (大)

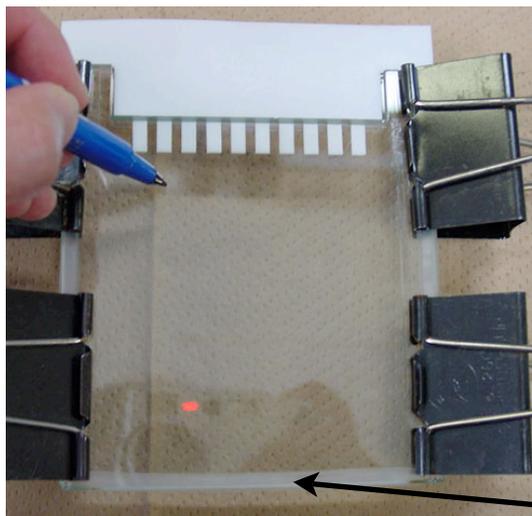
ゲル板を水でふいて次いでEtOHでふく

シリコンパッキンの凸がスペーサーのないゲル板にあたるように組み立てる



コームをさして、コームの先端から1 cmくらい下にマジックで印をつける

組み立て



底辺のシリコンを舟底型にすると泳動槽へのセットが楽チン。

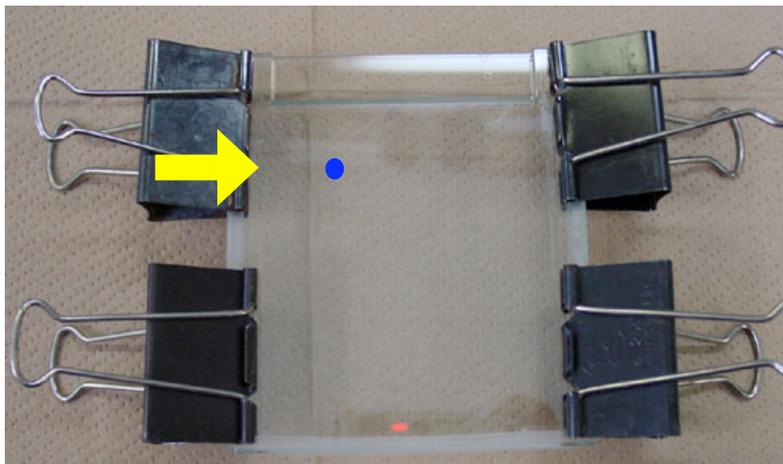
分離ゲル 10 mlをビーカーにとる
分離ゲルのアクリルアミド濃度は分析したい
タンパク質の分子量に合わせる。



← APS マイクロSPAチュラ軽く一杯を
100 ul Dwに溶解
75 ul加えて混ぜる

← TEMED
25 ul加えてよく混ぜる

ゲル板を立てて目印の位置まですばやく注ぐ
注いだら、EtOHが分離ゲルの液面を覆うくらいかける



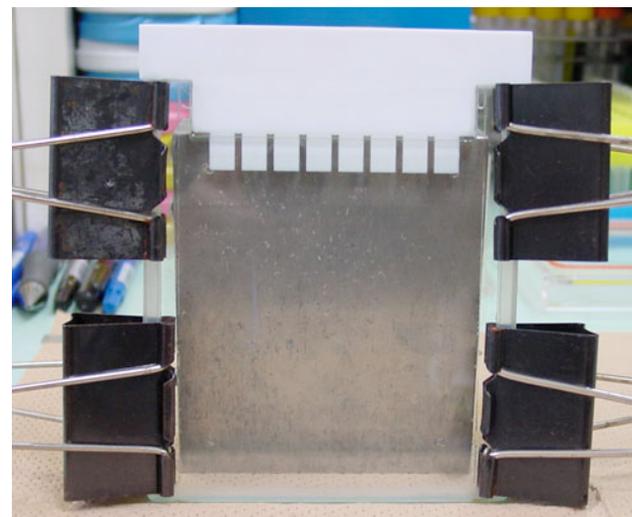
← 25 ul加えて混ぜる

← ビーカーに残ったゲルが固まるまで待つ
て、Dwでゲル表面のEtOHを洗い流す。
紙で水気を吸い取る。

濃縮ゲル 5 mlをビーカーにとる

← TEMED
15 ul加えてよく混ぜる

ゲル板を立てて上部まですばやく注ぐ
注いだら、コームをさす。



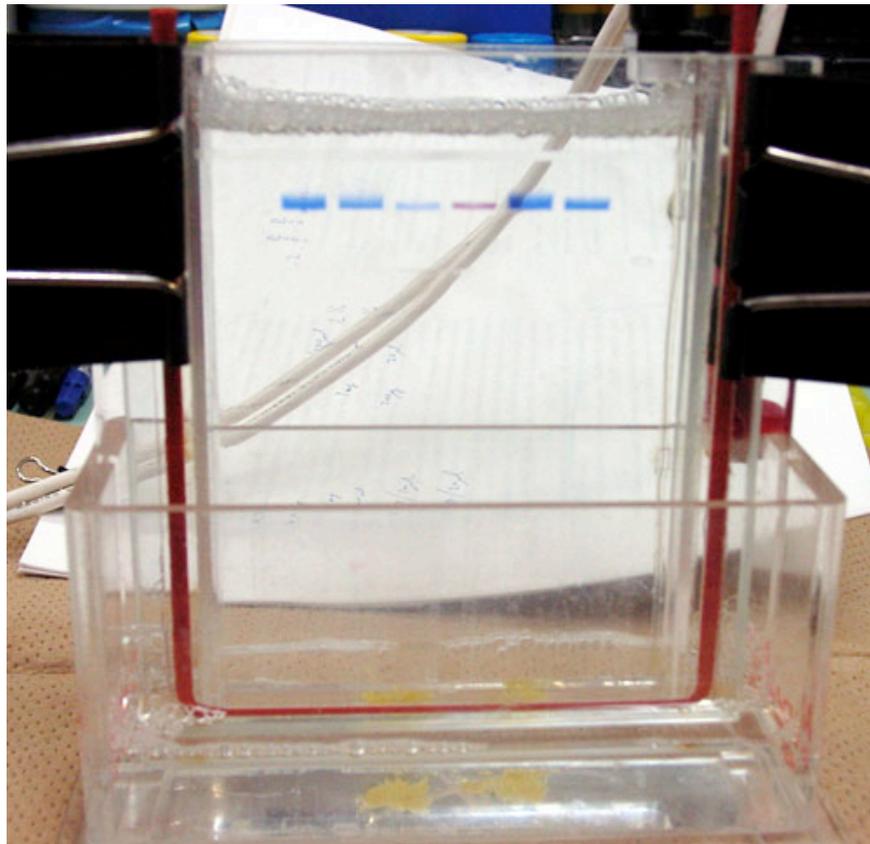
ビーカーに残ったゲルが固まったら出来上がり！コームを抜く前にゲル
板の斜めの部分に溜まった余分なゲルをとる。コームをそっと抜く。こ
のときコーム間の細長いゲルがクネクネしても後で直せるのでOK。
コームの平たい部分とゲル板の間のゲルは紙にくっつけてとる。

泳動槽にセット

ゲル板からシリコンパッキンをはずし上部泳動槽にクリップで止める。泳動槽ごとに形が違うのでそれに合わせてつける。

泳動槽下部にSDS pageバッファーを先にいれておいてゲル板の底辺を斜めに浸けていく。ゲル板の底辺に泡が入ると泡の部分だけ電気の流れが悪いので泡を入れないように。

上部泳動槽にバッファーを入れ、シリンジを用いてウェルを洗って細かなゲルかすをとばす。コーム間の細長いゲルがクネクネしていたらシリンジの先の針で直す。



サンプル, 1.5 ml tube使用。

タンパク質はPBSにけん濁しておく。不溶の場合サンプルバッファーにダイレクトにけん濁する。

サンプルバッファーに1/20のβメルカプトエタノール、もしくはbond breakerを加える。どちらもS-S結合を切る還元剤。βメルカプトエタノールは臭くて有害なのでbond breakerを推奨。

PBSにサンプルをけん濁した場合、等量加える

2~3 min茹でてS-S結合を切る

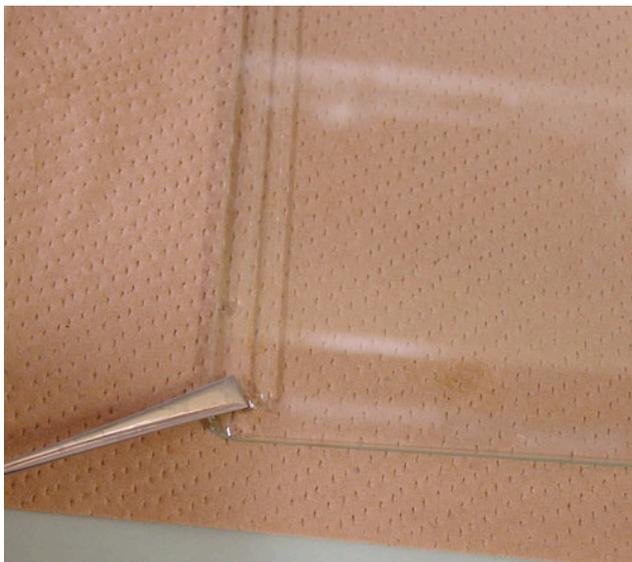
on ice

サンプルをアプライ。イエローチップで。ウェルのサイズによるが、だいたい10~40 ulアプライできる。

マーカーがブロードバンドが一般的。westernの場合は泳動中に見えるマーカー、カレイドスコープも泳動する。また、westernの場合はトランスファーしたサンプルを抗体処理するレーンとクマシーで染色するレーンに分けて、泳動象と抗体の結果を合わせてもいい。

25~30 mA, BPBの色素が流れきるくらいまで泳動。
だいたい1.5~2 hくらい

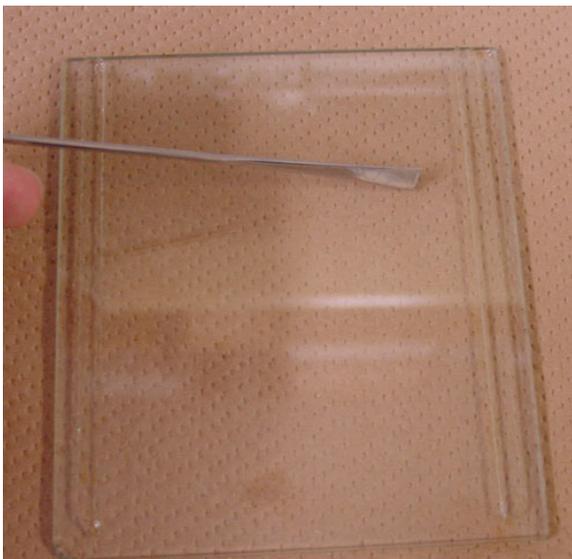
泳動が終わったら泳動槽からゲル板をはずす。マイクロスパチュラの反対側（平たい部分）をゲル板下すみに差し込み、ひねる。カパッと二枚のゲル板がはずれる。



イメージ図



濃縮ゲルと分離ゲルの境をマイクロスパチュラの平たい部分で切る。スパーサーと分離ゲルのくっついているところも同様に切る。



イメージ図



適切なサイズの容器の上でゲルのついている面を下にして、分離ゲルのはじをマイクロスパチュラの平たい部分で持ち上げると、ペロンと落ちる。意外と丈夫なので崩れない。



SDS pageのみ

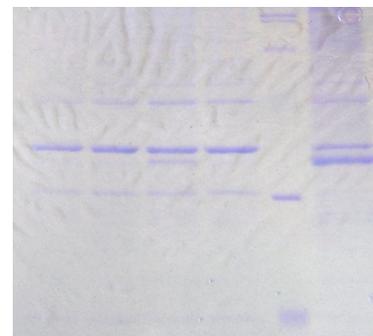
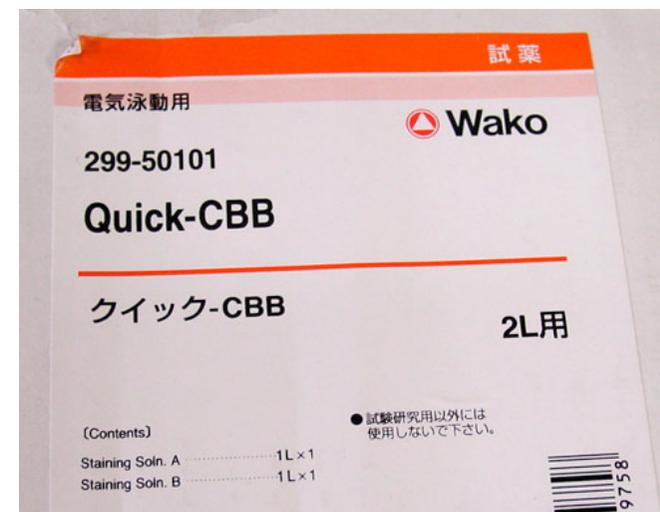
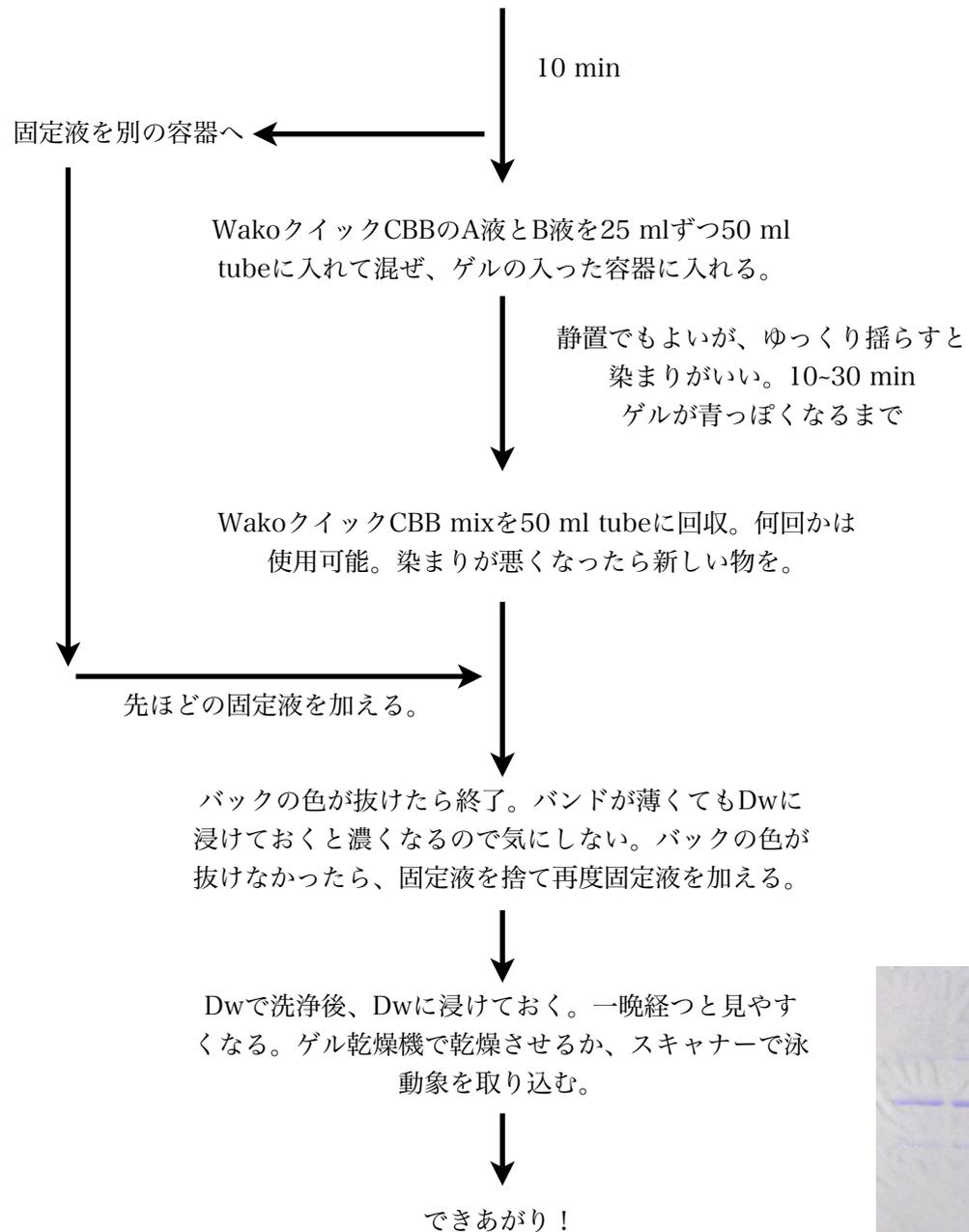


westernをやる

SDS pageで終わる場合。

適当なサイズの容器中のゲルがゆったり浸る程度、固定液を入れる。

MeOHが入っているのでラップを！



westernまでやる場合。

適当なサイズの容器中のゲルにtransfer bufferをゲルが浸る程度入れる。



9x9 cmのろ紙を6枚、Hibond-P(アマシャムファルマシア)を1枚切っておく。



Hibond-Pは浸る程度のMeOHに浸け、次いでDwに浸ける。



ろ紙をtransfer bufferに浸け、western blot transferマシンに、ろ紙、ろ紙、ろ紙、Hibond-P、ゲル、ろ紙、ろ紙、ろ紙、の順にのせていく。空気が入らないように！



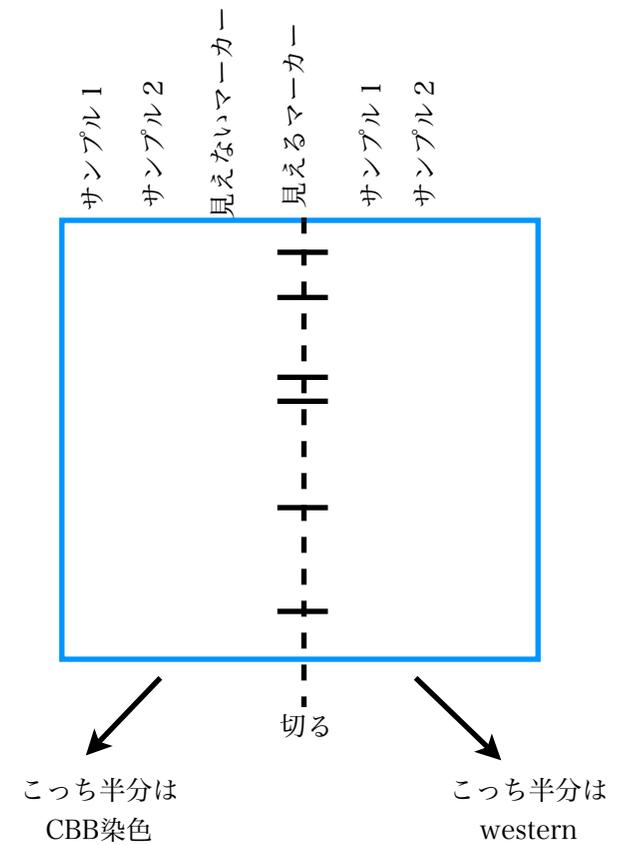
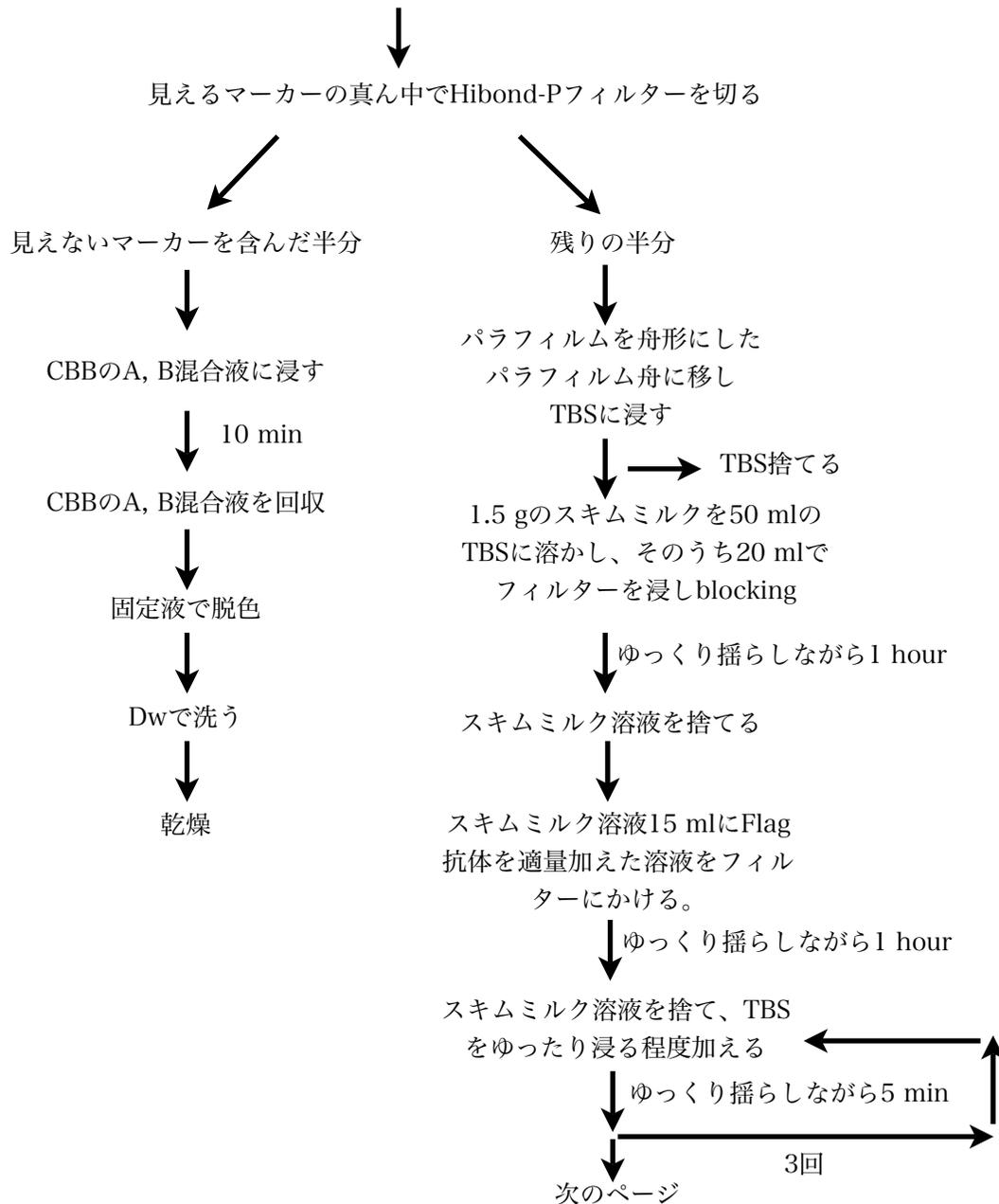
- ろ紙
- ろ紙
- ろ紙
- ゲル
- Hibond-P：方向があとでわかるように印をつけておく
- ろ紙
- ろ紙
- ろ紙

最後にtransfer bufferを少量かけて、電気の流れをよくする！



フタをして、25 Vで1.5-2 h

transferが終わったら、フタをとってろ紙をとってゲルをとる。
 トランスファーされてれば、見えるマーカーがHibond-Pフィルターにくっついて
 いるの見える。トランスファー後のゲルをCBBで染色することも可ではある
 けど、マーカーの一番長いところくらいしか見えないのであまり意味がない。



内側がパラフィルム舟

スキムミルク溶液15 mlにFlag
抗体を2 ul加えた溶液をフィル
ターにかける。

↓ ゆっくり揺らしながら1 hour

スキムミルク溶液を捨て、TBS
をゆったり浸る程度加える

↓ ゆっくり揺らしながら5 min

3回

↓ 遺伝子実験施設に行く

reagent1液とreagent2液を混ぜ、ラップにのせたフィルター
にかける。フィルターをひっくり返してまんべんなくつける。

↓ 化学発光開始!

↓ 余分な液体を紙で軽く吸い取る。

↓ ラップで包んで暗室でX線フィルムに感光させる。

↓ 現像

↓ 現像したフィルムとフィルターを合わせる。

↓ さらにCBB染色した半分と合わせる。

↓ できあがり!

← アマシャムファルマシア、ECL Western Blotting Detection Reagentsの
reagent1液とreagent2液を800 ulずつ2 ml tubeにとり、遺伝子実験施設に
持って行く。

