

SDS-PAGE (2 Layer)

ストック溶液

30%アクリルアミドストック溶液

アクリルアミド (モノマー)	60g
N, N'-メチレンビスアクリルアミド	1.6g
R.O.水	-
Total	200mL

4°C で保存する .

1.5M Tris-HCl (pH8.8)

54.5g の Tris を R.O.水に溶解し , 約 250mL に調製する .

HCl で pH を 8.8 に調製する . 中和熱で発熱するので室温に戻ってから数値を読み取る .

R.O.水を用いて 300mL にメスアップする .

4°C で保存する .

0.5M Tris-HCl (pH6.8)

6.0g の Tris を R.O.水に溶解し , 約 80mL に調製する .

HCl で pH を 6.8 に調製する . 中和熱で発熱するので室温に戻ってから数値を読み取る .

R.O.水を用いて 100mL にメスアップする .

10% SDS

SDS	10g
R.O.水	100mL

室温で保存する . 室温が低いと析出する可能性があるが , その場合温浴で溶かせばよい .

10% APS

過硫酸アンモニウム (ammonium persulfate ; APS) 0.1g

R.O.水 1mL

4°C , 遮光保存で 2 週間使用可能 .

TEMED

N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine. そのまま用いる .

50% グリセロール

3 層ゲルのストック溶液と共用できる .

SDS-PAGE (2 Layer)

1	Stacking	10.0%	12.5%	15.0%
A	1	2.67(0.89×3)	3.33(0.83×4)	4
B	-	2	2	2
C	0.1	0.1	0.1	0.1
D	2.5	-	-	-
dH2O	2.65(0.53×5)	3.23(0.54×6)	2.57(0.51×5)	1.9(0.95×2)
10%APS	100	60	60	60
TEMED	10	20	20	20
2	Stacking	10.0%	12.5%	15.0%
A	2	5.34(0.89×6)	6.66(0.83×8)	8
B	-	4	4	4
C	0.2	0.2	0.2	0.2
D	5	-	-	-
dH2O	5.3(0.53×10)	6.46(0.54×12)	5.14(0.51×10)	3.8(0.95×4)
10%APS	200	120	120	120
TEMED	20	40	40	40
3	Stacking	10.0%	12.5%	15.0%
A	3	8.01(0.89×9)	9.99(0.83×12)	12
B	-	6	6	6
C	0.3	0.3	0.3	0.3
D	7.5	-	-	-
dH2O	7.95(0.53×15)	9.69(0.54×18)	7.71(0.51×15)	5.7(0.95×6)
10%APS	300	180	180	180
TEMED	30	60	60	60
4	Stacking	10.0%	12.5%	15.0%
A	4	10.64(0.89×12)	13.32(0.83×16)	16
B	-	8	8	8
C	0.4	0.4	0.4	0.4
D	10	-	-	-
dH2O	10.6(0.53×20)	12.92(0.54×24)	10.28(0.51×20)	7.6(0.95×8)
10%APS	400	240	240	240
TEMED	40	80	80	80

- Solution A** 30%acrylamide, 0.8% BIS
acrylamide 30g, BIS 0.8g Fill up to 100ml
- Solution B** 1.5M Tris-HCl (pH8.8)
Tris 18.15g Adjust pH to 8.8 with HCl and fill up to 100ml
- Solution C** 10% SDS
SDS10g Fill up 100ml
- Solution D** 0.5M Tris-HCl (pH6.8)
Tris 6.0g Adjust pH to 6.8 with HCl and fill up to 100ml

2xSample buffer

SolutionD 10ml, 10% SDS 20mL, 50% glycerol 20ml, BPB2mg
Fill up to 50ml

10xSample buffer

Tris 30.3g, SDS 10g, Glicine 144g Fill up to 1L

ゲル作成

A~Dの各溶液, および ddH₂O を 50mL ビーカーで混合し, 静かに振り混ぜる.

ゲルを流し込む前に 10%APS を加え, 静かに, かつよく振り混ぜる.

TEMED を加える. チップの先を溶液につけて

running gel を 7 分目まで流しこみ, R.O.水を少量重層する.

running gel が固化(室温によるが約 15 分くらい)したら重層した R.O.水をキムワイブを用いて除去し, ガラス板にマジックで目印をつける.

stacking gel に 10%APS を加え静かに, かつよく振り混ぜる.

TEMED を加える. チップの先を溶液につけて

stacking gel を流し込み, コームを挿す.

固化したらコーム部分に水をかけながらコームを静かに抜き取る.

コーム部分の余分なゲルを洗う.

サンプルの調製

サンプル溶液に等量の 2×サンプルバッファーを加える.

100 , 15 分間煮沸する.

14,000rpm, 15 分間遠心する.

(サンプルの濃度が薄い場合)

サンプルと等量の 50%TCA を加える.

14,000rpm, 15 分間遠心する.

上清を完全に除去する.

サンプルバッファーを適量加える. このとき色が黄色になった場合, pH を調製していない Tris を加えて青色にする.

100 , 15 分間煮沸する.

14,000rpm, 15 分間遠心する.

泳動条件

ゲルが 1 枚のとき

定電流 (CC) で stacking gel まで 20mA, running gel から 50mA で 1 時間.

ゲルが 2 枚のとき (並列につないでいる場合)

定電流 (CC) で stacking gel まで 40mA, running gel から 100mA で 1 時間.

CBB 固定

前固定 (7~10 分)

前固定液 (40%メタノール, 10%酢酸) をタッパーに入れ, 泳動後のゲルを入れてシェーカーで振盪する.

染色 (3 分)

CBB 染色液 (50%メタノール, 5%酢酸, 0.5%[w/v]CBB-R250) をタッパーに注ぎ入れふたをして振盪する.

脱色

染色液を除き, R.O.水でよくすすぐ. 脱色液 (5%メタノール, 7%酢酸) を加え, キムワイブを入れて振盪する. 2 時間でいい感じに仕上がる.