

シャープマニファクチャリングシステム社

自動式電気泳動装置の実機取扱説明会

【セミナー資料 3】 2016年4月14日(木)

- 資料の学内限定公開についてはメルク株式会社の許可を得ておりますが、資料および音声データの二次配布については固く禁止させていただきます
- 問題が発生した場合、全てのセミナーデータを削除し、以降の公開ができなくなりますので、くれぐれもご注意ください

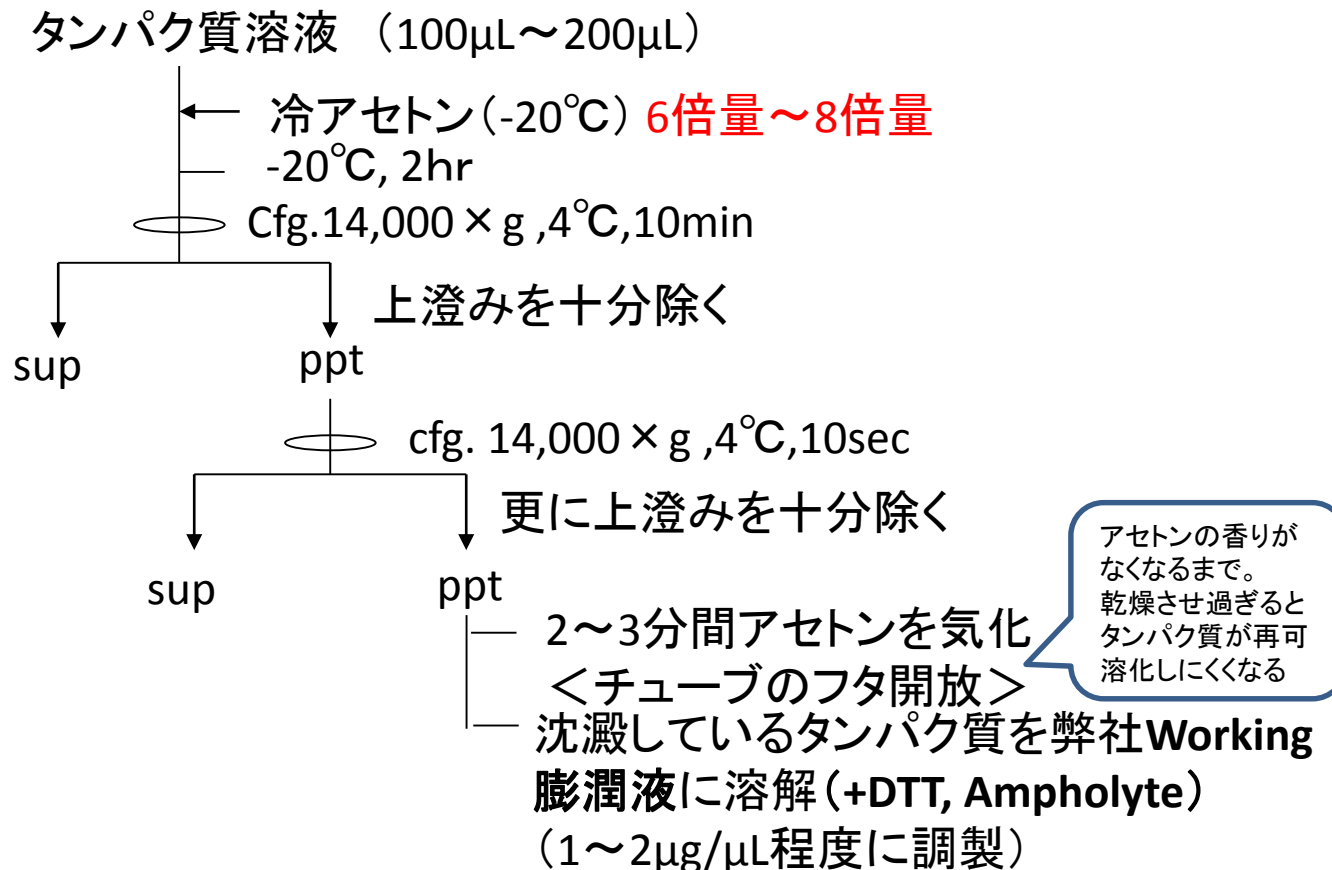
Auto2D 補足資料

～ampholyteおよび還元剤HEDの効果～

アセトン沈殿 ～脱塩精製①～

○メリット; 操作が簡便。1.5 mL ~ 2.0 mL チューブで行うと良い。

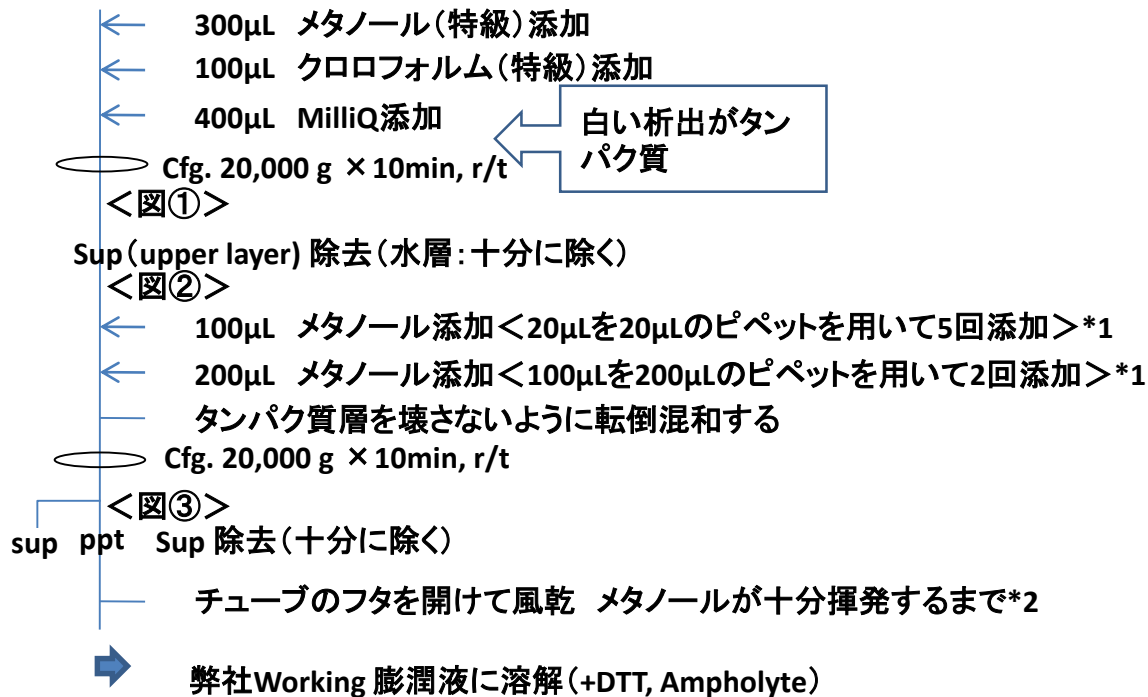
●デメリット; 高濃度の塩を含んでいる際には、除去できない場合がある。
タンパク質が高濃度の場合、回収率が低下する。



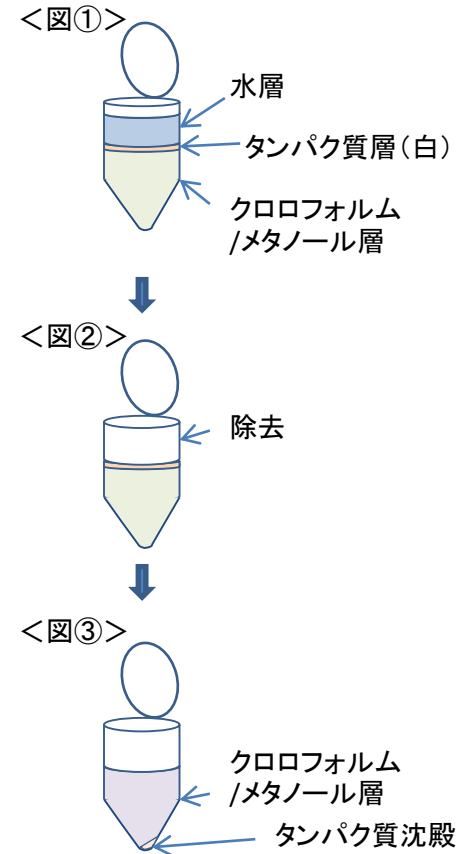
クロロフォルム/メタノール抽出 ～脱塩精製②～

【特徴】Urea, SDS等の水溶性共雑物の除去に適している、高収率

100 μ g/100 μ L程度になるようにタンパク質溶液を調整<1.5mL のミニチューブがお勧め



白い析出がタンパク質



*1: 中間層のタンパク質凝集体を壊さないように
 *2: 乾燥させ過ぎるとタンパク質が再可溶化しにくくなる

その他実績のある脱塩方法 ～脱塩精製③～

1. 2D-Clean up kit (GE ヘルスケア社およびBiorad社)
2. Zeba desalt spin column (Thermo scientific社 他)
3. VIVA SPIN (sartorius), Amicon Ultra (Merck Millipore)

* サンプルの溶解は弊社working膨潤液で行ってください。

* 限外ろ過タイプのスピンドバイスは、使用するポアサイズによって、脱塩・濃縮効率および回収率にバラツキが生じる(膜の詰まり等による)ことがあります。

・膨潤液 : 8M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS

・Working膨潤液 : 8M Urea, 2M Thiourea, 4% CHAPS, 50mM DTT, 0.5% ampholyte

弊社標準タンパク質(蛍光)調整方法および実験の流れ

- ・サンプルの蛍光標識から検出まで

タンパク質溶液 (1-2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

←1.5M Tris-HCl pH8.8 1 μL /50 μL

←250ng/ μL IC5-Osu 1 μL /50 μg protein

— r.t. 30min

←10mM L-Lysine 1 μL /50 μg protein

— r.t. 10min

Auto2Dで分離

アプライ量は0.1~2.0 μg 程度
スポット数により調整する

—100-150 min

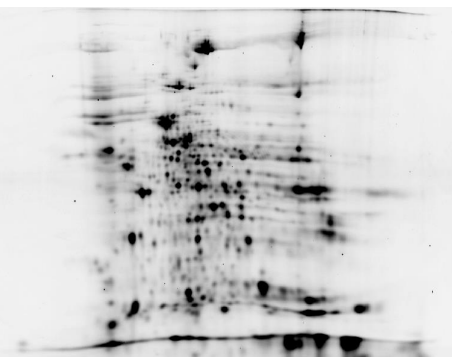
BM-A100LD(SHARP)

Total 約2時間30分

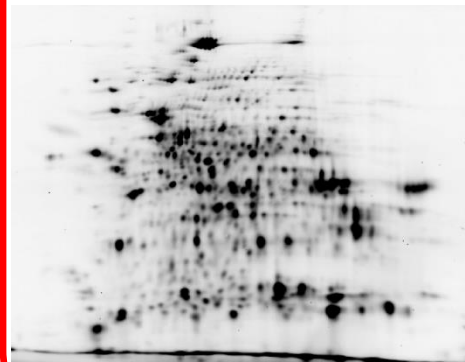
* サンプルの溶解および希釈は弊社working膨潤液で行ってください

Ampholyteの効果・違い

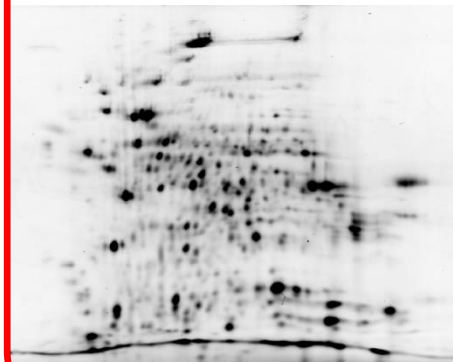
Invitrogen 0.5% [V/V]
ZOOM 3-10



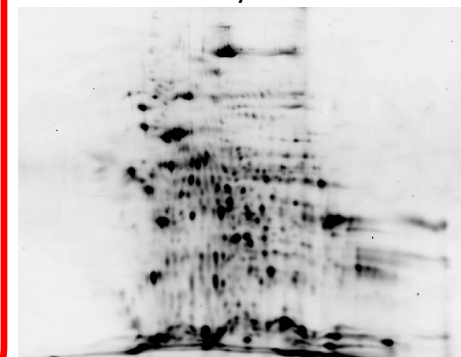
GE,Invitrogen 各0.25% [V/V]



Bio-rad 1.0% [V/V]
Biolyte3/10(100X)



GE 0.5% [V/V]
Pharmalyte3-10



推奨ampholyte

【pH3-10】

- Bio-rad社 Biolyte3/10 (100X) (#163-2094)
- Invitrogen社 ZOOM 3-10 と GE healthcare社 Pharmalyte3-10 を 1 : 1 で混合

【pH4-5.5】【pH5-6.5】【pH4-7】

- Invitrogen社 Carrier Ampholytes pH4-7 (ZM0022)

【pH6-10】【pH7-10】

- GE healthcare社 IPG Buffer pH 6-11 (17-6001-78)

SDS-PAGE推奨条件

OSDS-PAGE条件

陽極バッファー 4mL、陰極バッファー4.5mL

電力制御 2W

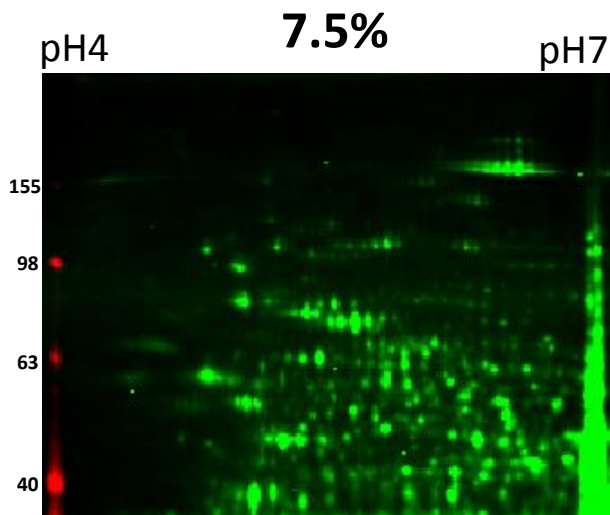
冷却温度 4°C

泳動時間 6.5% : 36分 (40.0mm)

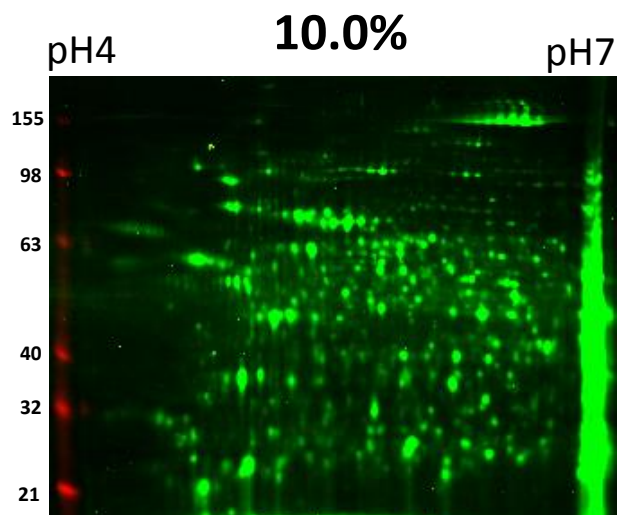
7.5% : 38分 (40.5mm)

10.0% : 40分 (38.8mm)

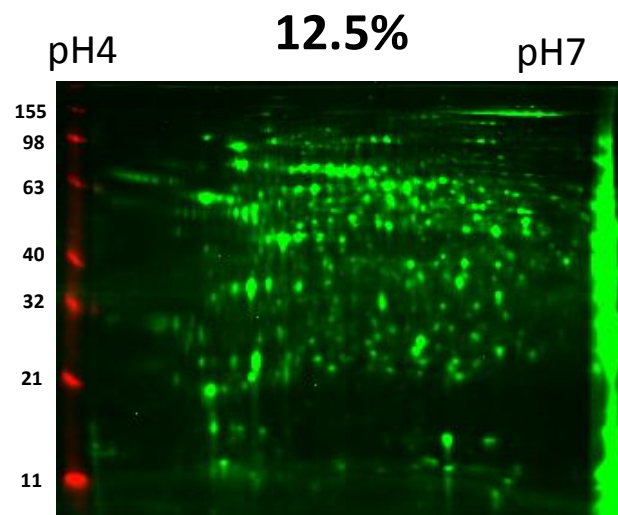
12.5% : 40分 (37.3mm)



2W, 38min, 4°C



2W, 40min, 4°C

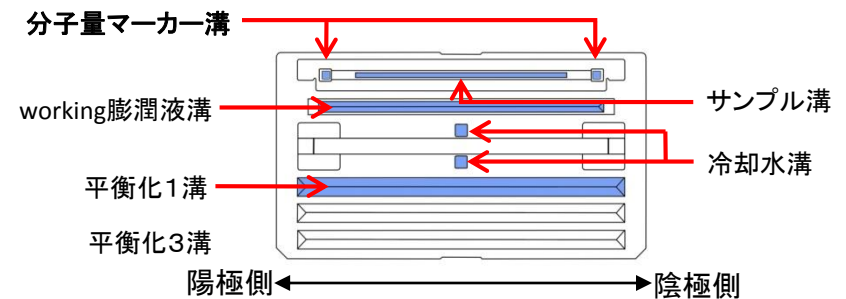
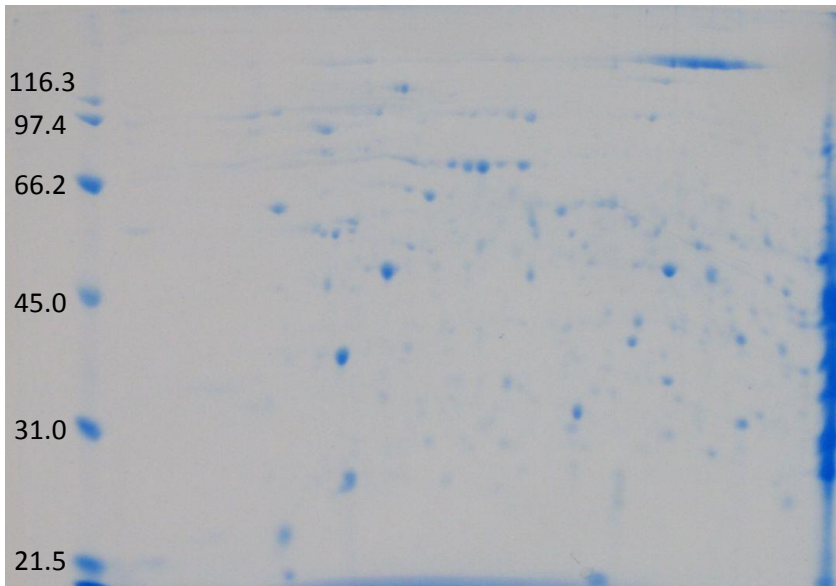


2W, 40min, 4°C

分子量マーカー対応チップ

・CBB染色で使用実績のある分子量マーカー

SDS-PAGEスタンダード Broad
(BIO-RAD) 161-0317



サンプル溝両端に設置された分子量マーカー溝にマーカーをアプライすることが可能です。

* アプライ量: 0.5~0.7 μ L

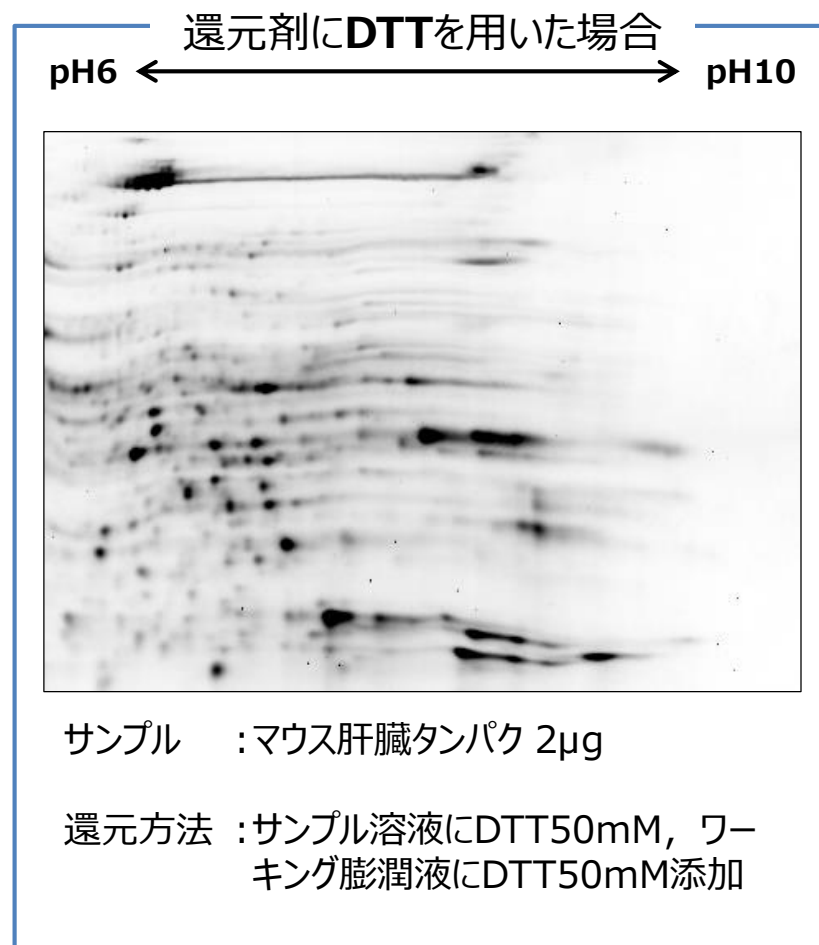
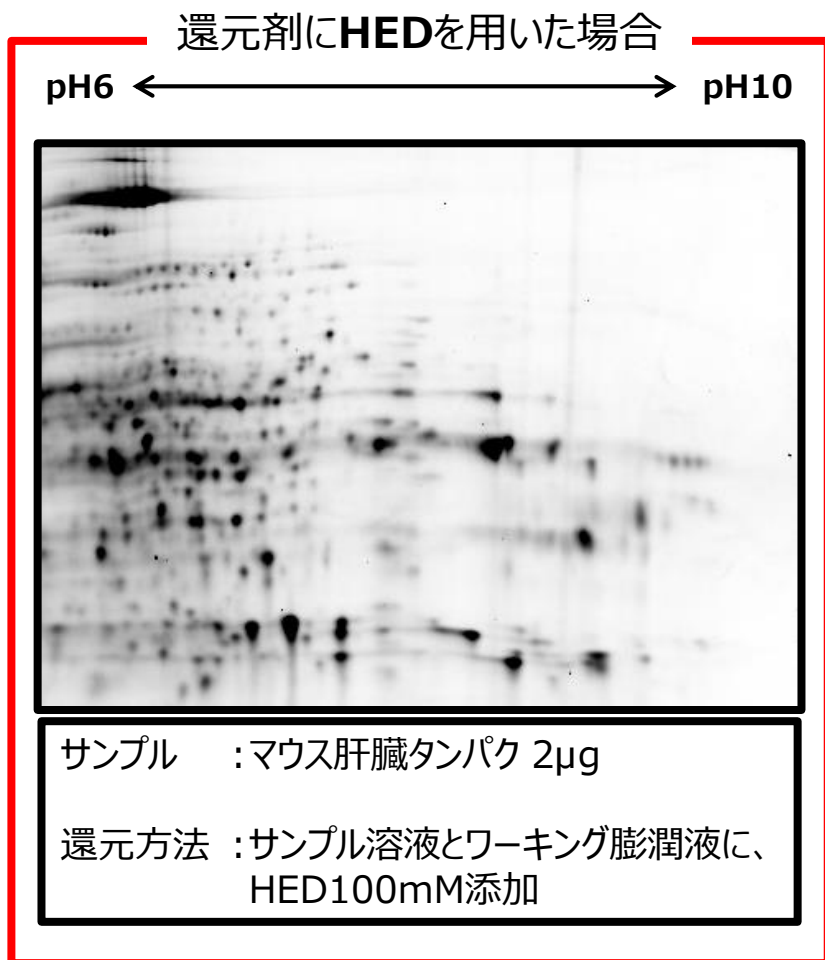
その他使用実績のある分子量マーカー

・TAKARA BIO社製Protein Molecular Weight Marker, Broad(3452)

・invitrogen社製BenchMark Fluorescent

* マーカーにはSDSを含まないタンパク質カクテルを使用してください。

塩基性領域における還元剤HEDの効果



還元剤にHED(2-hydroxyethyl disulfide)を用いることで、塩基性領域(pH7以上)のスポットのフォーカスが改善します。

参考文献 : Proteomics 2002, 2, 1630-1632 Olsson et al., "Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension"

pH6-10, pH7-10 Auto2D泳動条件

Auto2D泳動レシピ

サンプル導入		30min
膨潤		10min
IEF step1	200V 定電圧	5min
step2	1000V リニア	5min
step3	1000V 定電圧	5min
step4	4000V リニア	10min
step5	4000V 定電圧	15min
step6	8000V リニア	10min
step7	8000V 定電圧	20min
平衡化		5min
PAGE	2 W	40min

バッファーのレシピ (HED系)

サンプル溶液	: HED 100mM
→調整方法	: 膨潤液で溶かしたサンプル溶液10uLに2M HEDを0.5uL加える。
ワーキング膨潤液	: HED 100mM Ampholyte 0.5%(v/v)
→調整方法	: 膨潤液196uLにHEDを2.5uL, Ampholyteを1uL加える。200uLのうち100uLアプライする。
※	AmpholyteはGE製のpH6-11を使用
※	2M HEDは分注して-20℃で保存

還元方法がHEDとDTTの場合で、サンプル溶液と膨潤液の組成が異なります(右を参照)。

平衡化バッファーと陽極バッファーと陰極バッファーは他のpHレンジ(pH3-10など)と同じです。

2M HED の調整方法

HED : ddH₂O = 1 : 3

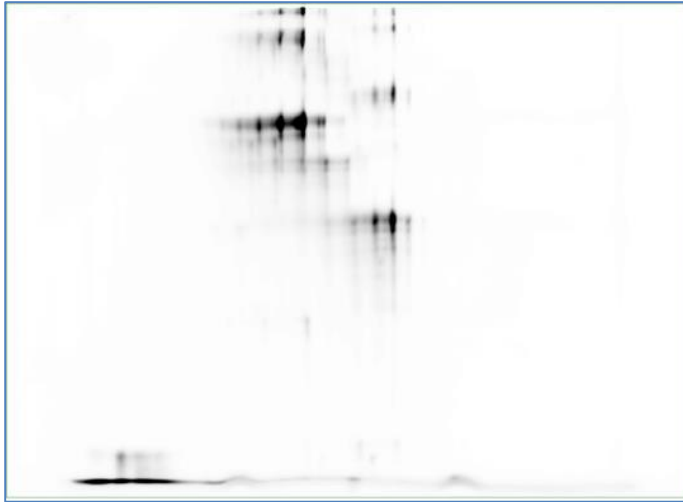
バッファーのレシピ (DTT系)

サンプル溶液	: DTT 50mM
ワーキング膨潤液	: DTT 50mM Ampholyte 0.5%(v/v)
※	AmpholyteはGE製のpH6-11を使用

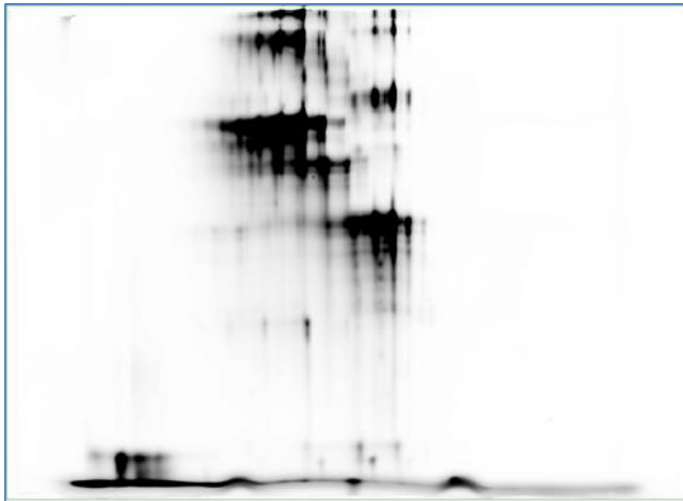
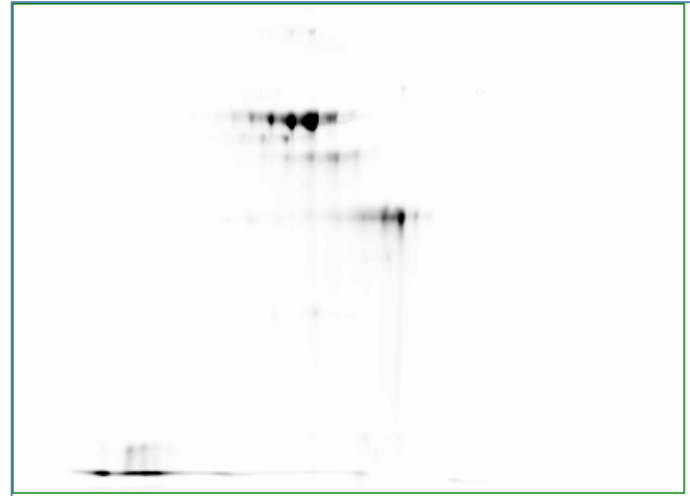
SDS平衡化バッファの組成

- ・Urea入りSDS平衡化バッファの効果 * 組成は次頁に示します

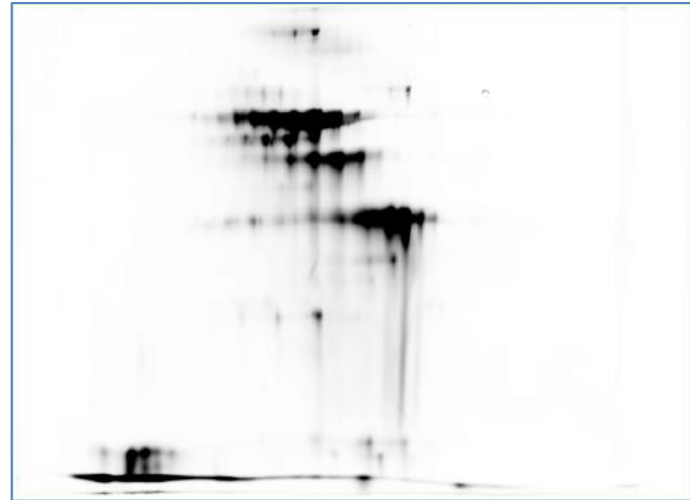
Ureaなし



7.5 Urea



Bmab



Bmab +7.5M Urea

SDS平衡化バッファの組成

・Urea入りSDS平衡化バッファ

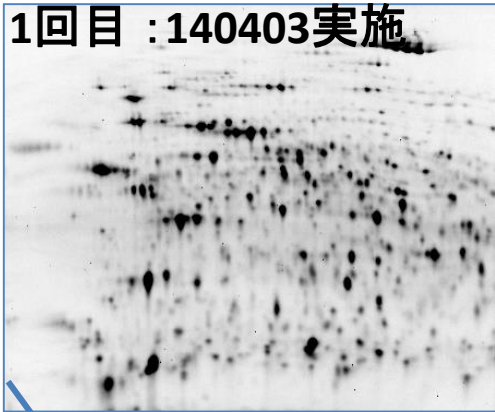
試薬	終濃度	レシピ重容量
Glycerol	20 w/v%	10.5 g
1.5M Tris-HCl (pH8.8)	500 mM	17.5 mL
SDS	4.75 w/v%	2.5 g
Urea	7.5 M	22.5 g
EDTA・2Na	0.5 mM	9.8 mg
BPB	0.005 w/v%	2.6 mg

⇒D.W.で50 mLまでメスアップ

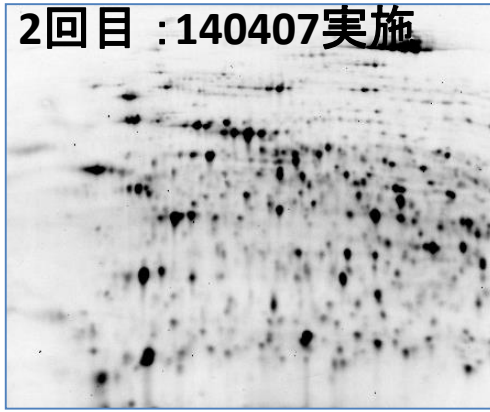
⇒950 μ L(1回分)ずつ分注して冷凍保存

Auto2Dの再現性について

1回目 : 140403実施



2回目 : 140407実施



3回目 : 140408実施

