

STE Bio Consultant

アクリルアミドゲル作成のコツ

高分離能のアクリルアミドゲル作成法

REA-001

タンパク質やDNAなどの分離に使用されるポリアクリルアミドゲル電気泳動で、各試薬の純度がアクリルアミドゲルの性能に影響を与えますが、分離に最も影響を与えるのは、アクリルアミドゲルの良否です。ここでは、アクリルアミドゲル作成の留意点を、各ステップ毎にまとめてみました。

Point

※アクリルアミドは、劇物です。評量時にはマスクと防塵メガネの使用をお薦めします。
使用管理記録は法律上の作成義務があります。

(1) 30%T モノマー溶液作成

アクリルアミドとビスの評量

アクリルアミド(劇物) : 29.2g/100ml
ビス : 0.8g/100ml

アクリルアミドとビスを、スターラーバーを入れた空のビーカーに入れる

Point

※アクリルアミドとビスが、舞い上がらないよう、ゆっくりと入れて下さい。

アクリルアミドとビス(粉末)の入ったビーカーに、80~90℃の精製水を加える

Point

※アクリルアミドとビスの溶解は吸熱的であり、温水を加えることで、溶解を早める。
※但し、余分な加熱による溶質の劣化(酸化)を防ぐ為、ヒートスターラーは使わない。

攪拌

溶液が室温に戻るまで、攪拌し、完溶させる。
(5時間以上~1昼夜)

攪拌

メスアップ後、0.22 μ mのフィルターで濾過・脱気する。

Point

※劣化を防ぎ、不要性微粒子を除去する。
※溶液が全て濾過された後も、吸引を続ける事で、モノマー溶液中を脱気し、保存酸素による酸化を防ぐ。
※但し、脱気する際に、完全に密封して、長時間脱気すると、アクリルアミドリニアなどが出来あがる為、濾過した状態で10~15分程度脱気することをお薦めします。

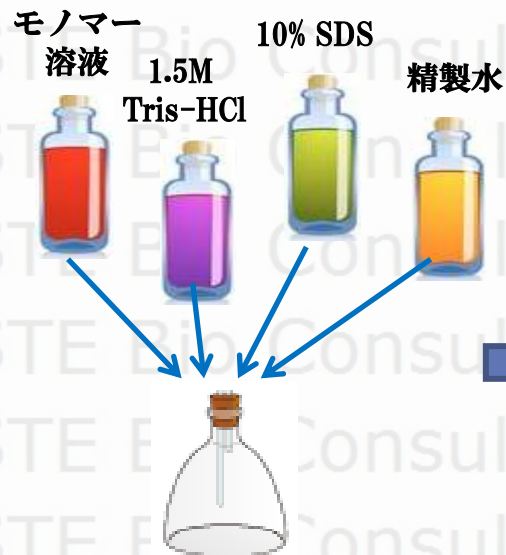
冷蔵庫で保存

STE Bio Consultant

アクリルアミドゲル作成のコツ

高分離能のアクリルアミドゲル作成法

(2) 分離ゲル作成



A%ゲル用溶液100ml作成の場合

30%モノマー溶液	: X ml
1.5M トリスー塩酸	: 25 ml
10% SDS	: 1.0 ml
精製水	: Y ml

$$X = 100 \times A \div 30$$

$$Y = 100 - 25 - 1 - 0.06 - X$$

※SDSは加えなくても良い

⇒精製水の量を増やす

分離ゲル作成後、濃縮ゲル作成前に、精製水で数回洗浄し、イソブタノールを完全に除去して下さい。



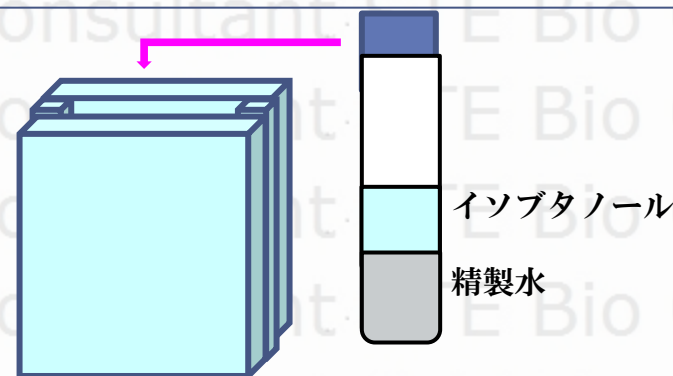
1つの試薬を添加する度に、即座に充分混ぜる。その際、気泡を発生させない。

Point

※APSとTEMEDを加えた場合、溶液中で、局部的に高濃度になっています。重合剤や重合促進剤が極度に濃度が高いと極めて短時間に部分的に急速なゲル化が進行するため、全体のゲルの一部分が不均一なゲルとなります。

※理想的には、気泡を発生させないように、溶液を回転させながら、その中に、APSとTEMEDを加える。

ガラスサンドイッチに溶液を入れ、水飽和イソブタノールを上置する。



Point

水飽和イソブタノール

モノマー溶液他を混ぜる前に精製水を加え、激しく混和し、静置しておく、使用時には、水飽和イソブタノール(上層)になっている。