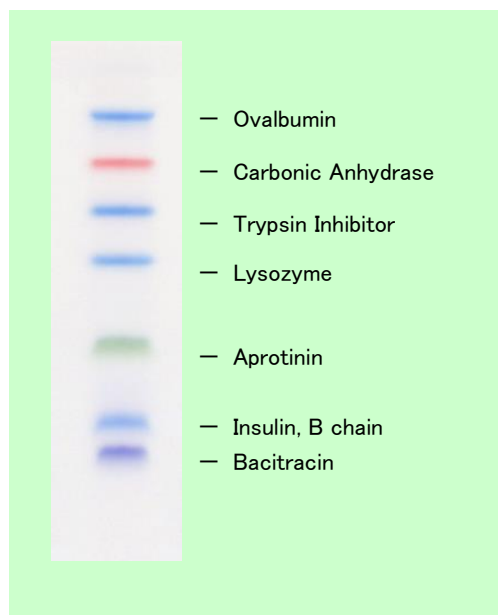


商品名:	DynaMarker <sup>®</sup> Protein MultiColor Stable, Low Range, Large
商品コード:	DM670L
ロット番号:	010BH04
容量:	200 $\mu$ l $\times$ 3 (DM670 $\times$ 3) (ミニゲルの場合、120 ロード分)
保存条件:	4 $^{\circ}$ C
保存期限:	4 $^{\circ}$ Cで 12 ヶ月
バッファー組成:	50 mM Tris-HCl (pH6.8), Urea, SDS, Glycerol, EDTA

DynaMarker<sup>®</sup> Protein MultiColor Stable, Low Range は着色済みタンパク質分子量マーカーです。本製品はすでにゲルローディングバッファーが添加されているため、加熱処理や還元剤添加は不要で、そのままアプライし泳動することができます。本製品は 4 $^{\circ}$ C 保存可能という特徴を持っており、常に液体状態であるため、速やかにゲルへアプライし電気泳動を開始することができます。本製品は 7 種類の着色済み天然タンパク質で構成され、見かけ分子量は約 2 kDa から 46 kDa の範囲で、青、赤、緑、紫に着色されており、電気泳動中に確認することができます。そのため電気泳動のモニタリングやメンブレンへの転写効率を確認することに適しています。各バンドのタンパク質量は、バンドの視認性が均一になるように調製されています。



DynaMarker<sup>®</sup> Protein MultiColor Stable, Low Range (5  $\mu$ l)

の泳動像

ゲル: 16% polyacrylamide (3%C)

泳動バッファー: Tris-Tricine-SDS バッファー

## プロトコル

1. 本製品を冷蔵庫から取り出します
2. 本製品を 5  $\mu$ l アプライします (ミニゲルの場合。ラージゲルの場合は 5  $\mu$ l 以上推奨)
3. 試料をアプライします
4. 電気泳動を開始します

**注意:** 加熱したり還元剤を加えたりする必要はありません。

## 構成タンパク質

タンパク質	色	見かけ分子量 (kDa) *
Ovalbumin	青	46.3
Carbonic Anhydrase	赤	30.8
Trypsin Inhibitor	青	22.6
Lysozyme	青	17.0
Aprotinin	緑	8.7
Inslin, B chain	青	3.9
Bacitracin	紫	1.7

泳動バッファー : Tris-Tricine-SDS バッファー <sup>(1)</sup>

**注意:** 共有結合した色素はタンパク質の移動度に影響を与えるため、本製品はロットごとに未着色タンパク質分子量マーカーを基準に見かけ分子量を算出しています。本製品を用いてお手持ちの試料の分子量を概算することはできますが、正確な分子量の測定には未着色タンパク質分子量マーカーをご使用ください。

\*: 見かけ分子量はロットごとに異なります。

## 推奨条件

DynaMarker<sup>®</sup> Protein MultiColor Stable, Low Range は、泳動バッファーとして Tris-Tricine-SDS バッファーを使用したポリアクリルアミドゲル電気泳動での低分子量タンパク質のモニタリング<sup>(1)</sup>や、転写効率の確認に適しています。

下記に使用例を示します。

### ・ $\beta$ -Amyloid (1-42) 検出実験

#### 1) 電気泳動

##### 1-1) 試薬調製 <sup>(2)</sup>

・Acrylamide-Bis stock solution (T:49.5%, C:3%)

Acrylamide	48 g
Bis-acrylamide	1.5 g
超純水	to 100 mL

・3× Gel buffer

3 M Tris-HCl (pH8.45), 0.3 % SDS

・10× Anode buffer

1.0 M Tris-HCl (pH8.9)

・10× Cathode buffer

1.0 M Tris, 1.0 M Tricine, 1.0 M SDS (pH 調整不要)

・4 × Sample buffer

150 mM Tris-HCl (pH7.0), 12 % SDS, 6 % mercaptoethanol, 30 % Glycerol, 0.05 % CBB

1-2) 16 %ポリアクリルアミドゲル (3 % C) の作製

次の表に従って 16 %分離ゲル溶液を調製し、ゲルの型に注ぎます。注いだ分離ゲル溶液の上に少量の水を重ね、分離ゲル中のアクリルアミドが十分に重合するまで静置します。その後、分離ゲルの上に重ねた水を除去し、表に従って調製した 4 %の濃縮ゲル溶液を注ぎ、静置します。

	4 % stacking gel	16 % separating gel
Acrylamid-Bis stock solution	1 ml	10 ml
3 × Gel buffer	3 ml	10 ml
Glycerol	—	2.4 ml
超純水	8 ml	7.6 ml
10 % APS	90 μl	100 μl
TEMED	9 μl	10 μl

1-3) 試料調製

次の表に従ってタンパク質試料を調製します。

タンパク質試料	15 μl
4 × Sample buffer	5 μl
	20 μl

95°Cで 5 分間加熱した後、氷上に置きます。

1-4) タンパク質試料および DynaMarker®Protein MultiColor Stable, Low Range の電気泳動

ポリアクリルアミドゲルを電気泳動装置にセットし、1 × Anode buffer と 1 × Cathode buffer を注ぎます。タンパク質試料と 5 μl の DynaMarker®MultiColor Stable, Low Range をウェルにアプライし、100~200 V で泳動します。

2) メンブレンへの転写

2-1) 試薬調製

・Transfer buffer (Towbin buffer)

25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20 % MeOH

・ニトロセルロースメンブレン (0.2 μm pore size)

注意: 低分子タンパク質の物理的特性は、タンパク質の種類により大きく違うため、メンブレンやバッファーの種類によって転写効率が異なります。

## 2-2) セミドライ式プロットイング

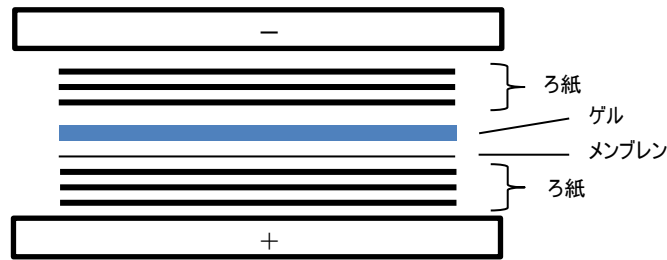


Figure 1, セミドライ式プロットイング

- 2-2-1) ろ紙 6 枚とニトロセルロースメンブレン 1 枚を用意します。
- 2-2-2) ろ紙とメンブレンを Transfer buffer に 10 分間浸します。
- 2-2-3) 転写装置の陽極側の転写板上にろ紙 3 枚を置きます。
- 2-2-4) メンブレンをろ紙の上に置きます。
- 2-2-5) ゲルをガラス板からメンブレンの上に移し、気泡を押し出します。  
(\*ここでメンブレンとゲルの間に気泡がないことを確認することが重要)
- 2-2-6) 残りの 3 枚のろ紙をゲルの上に置き、転写装置の陰極側の転写板をセットします。
- 2-2-7) 2 mA/cm<sup>2</sup> で 60 分間転写します。
- 2-2-8) マーカーがメンブレンに正常に転写されたことを確認した後、メンブレンを転写装置から取り出します。
- 2-2-9) メンブレンを PBS buffer で洗浄します。

## 3) 検出

- 3-1) メンブレンを PBS バッファーで数分(3~5 分)煮沸します。<sup>(3)</sup>
- 3-2) TBS をベースとしたタンパク質フリーのブロッキング剤(例: Pierce<sup>®</sup> Protein-Free T20 (TBS) Blocking Buffer \*)で 1 時間ブロッキングします。
- 3-3) TBS-T (0.05% Tween20) で 5 分間 × 3 回洗浄します。
- 3-4) 抗 β-アミロイド抗体(マウスモノクローナル)を添加し、一晩 4°C で反応させます。
- 3-5) TBS-T (0.05% Tween20) で 5 分間 × 3 回洗浄します。
- 3-6) ビオチン化抗マウス IgG 抗体と室温で 1 時間反応させます。
- 3-7) TBS-T (0.05% Tween20) で 5 分間 × 3 回洗浄します。
- 3-8) VECTASTAIN Elite ABC Standard kit\*\*で反応させます。  
(マニュアルを参照してください)
- 3-9) TBS-T (0.05% Tween20) で 5 分間 × 3 回洗浄します。
- 3-10) DAB Peroxidase substrate kit\*\*\*で染色します。  
(マニュアルを参照してください)

\*: Pierce<sup>®</sup> Protein-Free T20 (TBS) Blocking Buffer は Thermo Fisher scientific, Inc.の製品です

\*\* : VECTASTAIN Elite ABC Standard kit は Vector laboratories, Inc.の製品です

\*\*\*: DAB peroxidase substrate kit は Vector laboratories, Inc.の製品です

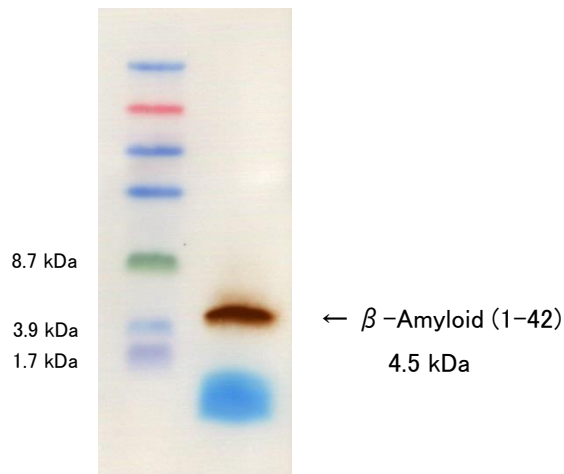


Figure 2,  $\beta$ -Amyloid (1-42)の検出

#### 参考文献

- (1) Hermann schägger and Gebhard Von Jagow. Tricine–Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368–379 (1987).
- (2) Hermann schägger. Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols.* 1, 16–22 (2006)
- (3) Nobuo Ida, *et.al.* Analysis of Heterogeneous  $\beta$  A4 Peptide in Human Cerebrospinal Fluid and Blood by a Newly Developed Sensitive Western Blot Assay. *J. Biol. Chem.* 271, 22908–22914 (1996)

関連製品	
DM660	<b>DynaMarker® Protein MultiColor Stable II</b> 4°C保存可能な着色済みタンパク質分子量マーカー (約 8~230 kDa)
DS500	<b>QuickBlue Staining Solution</b> 洗浄・脱色を含めたタンパク質の CBB 染色が約 90 分で行える