(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3679117号
(P3679117)
(45)発行日　平成17年8月3日(2005.8.3)　(24)登録日　平成17年5月20日(2005.5.20)

(51)Int.Cl.[7]　F I
G01N 27/447　G01N 27/26　315F
G01N 27/26　301B

請求項の数 67　(全 12 頁)

(21)出願番号　特願平7-525759
(86)(22)出願日　平成7年3月29日(1995.3.29)
(65)公表番号　特表平9-512907
(43)公表日　平成9年12月22日(1997.12.22)
(86)国際出願番号　PCT/US1995/003647
(87)国際公開番号　WO1995/027197
(87)国際公開日　平成7年10月12日(1995.10.12)
審査請求日　平成14年3月26日(2002.3.26)
(31)優先権主張番号　08/221,939
(32)優先日　平成6年3月31日(1994.3.31)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　502221282
インヴィトロジェン　コーポレーション
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２００８，カールスバッド，ファラデイ　アベニュー　１６００
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　エンゲルホーン，　シェルドン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２０２４，　エンシニタス，オーク　バールレーン　７３４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】中性ｐＨ長寿命プレキャスト電気泳動ゲルのためのシステム

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ゲル電気泳動システムであって、

分離電気泳動ゲル；および

中性付近のｐＫａを有する有機アミンを含有し、酸により滴定されたゲルバッファーであって、ｐＨ６とｐＨ７との間のｐＨを有するゲルバッファー、

を包含する、システム。

【請求項２】

ゲル電気泳動システムであって、

分離電気泳動ゲル；および

中性付近のｐＫａを有する有機アミンを含有し、酸により滴定されたゲルバッファーであって、中性付近のｐＨを有するゲルバッファー、

を包含する、システム。

【請求項３】

前記ゲルが、多孔性ポリマーを含有する、請求項１または請求項２に記載のシステム。

【請求項４】

前記ポリマーが、ポリアクリルアミドを含有する、請求項３に記載のシステム。

【請求項５】

前記ゲルが、プレキャストであり、そして保存のために適合されている、請求項１～４のいずれか１項に記載のシステム。

【請求項６】
前記アミンが、ビス（２－ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタンである，請求項１または請求項２に記載のシステム。
【請求項７】
前記酸が塩酸である、請求項１または請求項２に記載のシステム。
【請求項８】
前記ゲルバッファーが、さらにドデシル硫酸塩を含有する、請求項１または請求項２に記載のシステム。
【請求項９】
前記塩が、ドデシル硫酸ナトリウムである、請求項８に記載のシステム。
【請求項１０】
前記システムが、さらにカソードバッファーを含有する、請求項１または請求項２に記載のシステム。
【請求項１１】
前記カソードバッファーが、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを含有する、請求項１０に記載のシステム。
【請求項１２】
前記カソードバッファーが、両性イオン種を含有する、請求項１０に記載のシステム。
【請求項１３】
前記両性イオン種が、３－（Ｎ－モルホリノ）－プロパンスルホン酸、２－（Ｎ－モルホリノ）－エタンスルホン酸、Ｎ－（２－アセトアミド）－２－アミノエタンスルホン酸、３－（Ｎ－モルホリノ）－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸、Ｎ－［トリス（ヒドロキシメチル）メチル］－２－アミノエタンスルホン酸、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）－ピペラジン－Ｎ’－（２－エタンスルホン酸）、Ｎ，Ｎ－ビス（２－ヒドロキシエチル）－２－アミノエタンスルホン酸、および３－（Ｎ－トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ）－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸からなる群から選択される、請求項１２に記載のシステム。
【請求項１４】
前記両性イオン種が、３－（Ｎ－モルホリノ）－プロパンスルホン酸である、請求項１３に記載のシステム。
【請求項１５】
前記両性イオン種が、２－（Ｎ－モルホリノ）－エタンスルホン酸である、請求項１３に記載のシステム。
【請求項１６】
前記カソードバッファーが、中性ｐＨで負に荷電した還元剤を含有する、請求項１０に記載のシステム。
【請求項１７】
前記還元剤が、亜硫酸塩を含有する、請求項１６に記載のシステム。
【請求項１８】
前記還元剤が、チオールを含有する、請求項１６に記載のシステム。
【請求項１９】
前記還元剤が、チオグリコール酸である、請求項１８に記載のシステム。
【請求項２０】
前記システムが、さらにアノードバッファーを含有する、請求項１または請求項２に記載のシステム。
【請求項２１】
前記アノードバッファーが、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを含有する、請求項２０に記載のシステム。
【請求項２２】
中性付近のｐＫａを有する有機アミンを含有し、酸により滴定されたゲルバッファーによ

り、均一に飽和されていることを特徴とする分離電気泳動ゲルであって、該ゲルバッファーがｐＨ６とｐＨ７との間のｐＨを有する、分離電気泳動ゲル。
【請求項２３】
中性付近のｐＫａを有する有機アミンを含有し、酸により滴定されたゲルバッファーにより、均一に飽和されていることを特徴とする分離電気泳動ゲルであって、該ゲルバッファーが中性付近のｐＨを有する、分離電気泳動ゲル。
【請求項２４】
前記ゲルが、多孔性ポリマーを含有する、請求項２２または請求項２３に記載の電気泳動ゲル。
【請求項２５】
前記ポリマーが、ポリアクリルアミドを含有する、請求項２４に記載の電気泳動ゲル。
【請求項２６】
前記ゲルが、プレキャストであり、そして保存のために適合されている、請求項２２～２５のいずれか１項に記載の電気泳動ゲル。
【請求項２７】
前記アミンが、ビス（２－ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタンである、請求項２２または請求項２３に記載の電気泳動ゲル。
【請求項２８】
前記酸が塩酸である、請求項２２または請求項２３に記載の電気泳動ゲル。
【請求項２９】
電気泳動を行うための方法であって、
分離電気泳動ゲルを横切って電位差を印加する工程を包含し、該電気泳動ゲルが、中性付近のｐＫａを有する有機アミンを有し、酸により滴定されているゲルバッファーを含有し、該ゲルバッファーが、ｐＨ６とｐＨ７との間のｐＨを有する、方法。
【請求項３０】
電気泳動を行うための方法であって、
分離電気泳動ゲルを横切って電位差を印加する工程を包含し、該電気泳動ゲルが、中性付近のｐＫａを有する有機アミンを有し、酸により滴定されているゲルバッファーを含有し、該ゲルバッファーが、中性付近のｐＨを有する、方法。
【請求項３１】
前記ゲルが、多孔性ポリマーを含有する、請求項２９または請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記ポリマーが、ポリアクリルアミドを含有する、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記ゲルが、プレキャストであり、そして保存のために適合されている請求項２９～３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３４】
前記アミンが、ビス（２－ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタンである、請求項２９または請求項３０に記載の方法。
【請求項３５】
前記酸が塩酸である、請求項２９または請求項３０に記載の方法。
【請求項３６】
前記ゲルバッファーが、さらにドデシル硫酸塩を含有する、請求項２９または請求項３０に記載の方法。
【請求項３７】
前記塩が、ドデシル硫酸ナトリウムである、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記電気泳動ゲルを、カソードバッファーおよびアノードバッファーに接触させる先行の工程をさらに包含する、請求項２９または請求項３０に記載の方法。
【請求項３９】

前記アノードバッファーが、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを含有する、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記カソードバッファーが、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを含有する、請求項３８に記載の方法。
【請求項４１】
前記カソードバッファーが、両性イオン種を含有する、請求項３８に記載の方法。
【請求項４２】
前記両性イオン種が、３－（Ｎ－モルホリノ）－プロパンスルホン酸、２－（Ｎ－モルホリノ）－エタンスルホン酸、Ｎ－（２－アセトアミド）－２－アミノエタンスルホン酸、３－（Ｎ－モルホリノ）－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸、Ｎ－［トリス（ヒドロキシメチル）メチル］－２－アミノエタンスルホン酸、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）－ピペラジン－Ｎ’－（２－エタンスルホン酸）、Ｎ，Ｎ－ビス（２－ヒドロキシエチル）－２－アミノエタンスルホン酸、および３－（Ｎ－トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ）－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸からなる群から選択される、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記両性イオン種が、３－（Ｎ－モルホリノ）－プロパンスルホン酸である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記両性イオン種が、２－（Ｎ－モルホリノ）－エタンスルホン酸である、請求項４２に記載の方法。
【請求項４５】
前記カソードバッファーが、中性ｐＨで負に荷電した還元剤を含有する、請求項３８に記載の方法。
【請求項４６】
前記還元剤が、亜硫酸塩を含有する、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記還元剤が、チオールを含有する、請求項４５に記載の方法。
【請求項４８】
前記還元剤が、チオグリコール酸である、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
ゲル電気泳動システムであって、
ゲルバッファーを含有する分離用電気泳動ゲルであって、該ゲルバッファーが中性付近にｐＫａを有する有機アミンを含有し、酸により滴定されており、ｐＨ６とｐＨ７との間のｐＨを有する、分離電気泳動ゲル；および該ゲルに接触しているランニングバッファー、
を包含する、システム。
【請求項５０】
ゲル電気泳動システムであって、
ゲルバッファーを含有する分離用電気泳動ゲルであって、該ゲルバッファーが中性付近にｐＫａを有する有機アミンを含有し、酸により滴定されており、中性付近のｐＨを有する、分離電気泳動ゲル；および該ゲルに接触しているランニングバッファー、
を包含する、システム。
【請求項５１】
前記ゲルが、多孔性ポリマーを含有する、請求項４９または請求項５０に記載のシステム。
【請求項５２】
前記ポリマーが、ポリアクリルアミドを含有する、請求項５１に記載のシステム。
【請求項５３】
前記ゲルが、プレキャストであり、そして保存のために適合されている、請求項４９～５

２のいずれか１項に記載のシステム。
【請求項５４】
前記ゲルバッファーのアミンが、ビス（２－ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタンである、請求項４９または請求項５０に記載のシステム。
【請求項５５】
前記ゲルバッファーの酸が塩酸である、請求項４９または請求項５０に記載のシステム。
【請求項５６】
前記ゲルバッファーが、さらにドデシル硫酸塩を含有する、請求項４９または請求項５０に記載のシステム。
【請求項５７】
前記塩が、ドデシル硫酸ナトリウムである、請求項５６に記載のシステム。
【請求項５８】
前記ランニングバッファーが、有機アミンおよび両性イオン種を含有する、請求項４９または請求項５０に記載のシステム。
【請求項５９】
前記ランニングバッファーのアミンが、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンである、請求項５８に記載のシステム。
【請求項６０】
前記ランニングバッファーのアミンが、ビス（２－ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタンである、請求項５８に記載のシステム。
【請求項６１】
前記ランニングバッファーの両性イオン種が、３－（Ｎ－モルホリノ）－プロパンスルホン酸、２－（Ｎ－モルホリノ）－エタンスルホン酸、Ｎ－（２－アセトアミド）－２－アミノエタンスルホン酸、３－（Ｎ－モルホリノ）－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸、Ｎ－［トリス（ヒドロキシメチル）メチル］－２－アミノエタンスルホン酸、Ｎ－（２－ヒドロキシエチル）－ピペラジン－Ｎ’－（２－エタンスルホン酸）、Ｎ，Ｎ－ビス（２－ヒドロキシエチル）－２－アミノエタンスルホン酸、および３－（Ｎ－トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミノ）－２－ヒドロキシプロパンスルホン酸からなる群から選択される、請求項５８に記載のシステム。
【請求項６２】
前記ランニングバッファーの両性イオン種が、３－（Ｎ－モルホリノ）－プロパンスルホン酸である、請求項６１に記載のシステム。
【請求項６３】
前記ランニングバッファーの両性イオン種が、２－（Ｎ－モルホリノ）－エタンスルホン酸である、請求項６１に記載のシステム。
【請求項６４】
前記ランニングバッファーが、さらに中性ｐＨで負に荷電した還元剤を含有する、請求項４９または請求項５０に記載のシステム。
【請求項６５】
前記ランニングバッファーの還元剤が、亜硫酸塩を含有する、請求項６４に記載のシステム。
【請求項６６】
前記ランニングバッファーの還元剤が、チオールを含有する、請求項６４に記載のシステム。
【請求項６７】
前記ランニングバッファーの還元剤が、チオグリコール酸である、請求項６６に記載のシステム。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
中性ｐＨ長寿命プレキャスト電気泳動ゲルのためのシステム

本発明は、ゲル電気泳動のための技術に関する。より詳細には、本発明は、ほぼ中性pHでのゲル電気泳動のための新規なシステムおよび当該システムを用いて電気泳動を実施する方法に関する。

【０００２】

発明の背景

ゲル電気泳動は、DNA、RNA、ポリペプチド、およびタンパク質のような生体分子を分離するための通常の手段である。ゲル電気泳動において、この分子は、かけられた電場により分子がフィルタリングゲル中を移動する割合によって、バンドに分離される。

【０００３】

この技術を用いる基本的な装置は、ガラスチューブに封入された、あるいはガラスまたはプラスチックプレート間にスラブとして挟まれたゲルからなる。このゲルは、オープンモレキュラーネットワーク構造を有し、電気伝導性の緩衝化された塩の溶液で飽和されている細孔を規定している。ゲル中のこれらの細孔は、移動するマクロ分子が通過し得るのに十分に大きい。

【０００４】

ゲルは、チャンバー中にバッファー溶液と接触するように置かれ、ゲルと電力供給源のカソードまたはアノードとの間を電気的に接触させる。マクロ分子および追跡用色素を含有するサンプルが、ゲルの一番上に置かれる。電位をゲルにかけると、サンプルのマクロ分子および追跡用色素は、ゲルの底に向かって移動する。電気泳動は、追跡用色素がゲルの末端に到達する直前に停止される。次いで、分離されたマクロ分子のバンドの位置が測定される。移動度が既知の追跡用色素およびマクロ分子と比べて、特定のバンドが移動した距離を比較することによって、他のマクロ分子の移動度が測定され得る。次いで、マクロ分子のサイズが計算され得る。

【０００５】

ゲル中のマクロ分子の移動速度は、３つの主要なファクターに依存している：ゲルの多孔度；マクロ分子のサイズおよび形；そしてマクロ分子の電荷密度である。これらの３つのファクターが精密に制御され、ゲルごとならびにサンプルごとに再現性があるということが、効果的な電気泳動システムにとって重要である。しかし、ゲル間の均一性を維持することは困難である。なぜなら、これらのファクターのそれぞれは、ゲルシステムの化学における多くの変数に対して敏感であるからである。

【０００６】

ポリアクリルアミドゲルが、通常、電気泳動に使用される。ポリアクリルアミドゲル電気泳動、言い換えればPAGEが一般的である。なぜなら、このゲルは、光学的に透明で、電気的に中性であり、そして孔径の範囲に応じて作製され得るからである。ポリアクリルアミドゲルの多孔度は、ゲルに含まれるアクリルアミドモノマーと架橋剤モノマーとの全パーセント（「%T」）によって、ある程度規定される。濃度が高ければ高いほど、ポリアクリルアミドマトリックスの鎖の間にある空間は小さくなり、従ってゲル中の細孔は小さくなる。８％ポリアクリルアミドゲルは、12%ポリアクリルアミドゲルよりも大きな細孔を有する。従って、８％ポリアクリルアミドゲルでは、所定の形状、サイズ、および電荷密度を有するマクロ分子は、より早く移動し得る。より小さいマクロ分子を分離する場合には、一般に、より小さな孔径を有するゲル（例えば、20%ゲル）を使用するのが好ましい。反対に、より大きなマクロ分子を分離するには、より大きな孔径を有するゲル（例えば、８％ゲル）がしばしば使用される。

【０００７】

孔径はまた、ゲルを重合するために使用される架橋剤の量に依存する。任意の所定の全モノマー濃度における、ポリアクリルアミドゲルについての最小孔径は、全モノマーの架橋剤に対する比が約20：１である場合に得られる（この比は、通常「5%C」と表現される）。

【０００８】

いくつかのファクターにより、ゲルの孔径において望ましくない変化が起こり得る。孔径

は、製造の際の不完全なゲル重合により増大され得る。重合後のポリアクリルアミドゲルの加水分解は、固定負電荷を作りだし、そしてゲル中の架橋が分解され得る。これにより、分離能が低下し、そして孔径は増大する。理想のゲルシステムは、再現性のある孔径を有し、固定電荷を有しない（または、少なくとも一定量を有する）べきであり、そして化学的な特性の変化または加水分解に起因する孔径の変化に対して抵抗力があるべきである。

【０００９】

マクロ分子のサイズは、種々のマクロ分子間で異なる；より小さく、よりコンパクトなマクロ分子であればあるほど、マクロ分子は所定のゲルの細孔中をより容易に移動することになる。一定の電荷密度ならば、マクロ分子の移動の速度は、そのサイズの対数に反比例する。

【００１０】

正確で再現性のある電気泳動のためには、好ましくは一定のタイプのマクロ分子が、ゲルの単一の型について選択されるべきである。ゲル電気泳動の際にタンパク質の形の均一性の維持が困難であることの１つは、ジスルフィド結合が１対のシステインアミノ酸の酸化により形成され得るということである。タンパク質の異なる酸化形態は、次いで、異なる形状を有することとなり、それゆえ、ゲル中の移動は、わずかに異なる移動度を有する泳動となる（通常、完全に還元されたタンパク質よりも早くなる。なぜなら、最大ストークス半径および最小移動度が、完全に折りたたまれていない形態で起こるはずだからである）。不均一混合物の形態では、明らかにバンドはブロードになる。ジスルフィド結合の形成を防ぐためには、ジチオトレイトール（DTT）のような還元剤が、通常、泳動のためのサンプルに加えられる。

【００１１】

移動する分子の電荷密度は、ゲル中の移動の速度に影響を及ぼす第３のファクターである。電荷密度が高ければ高いほど、より強い力が電場によってマクロ分子にかけられ、そしてサイズおよび形状の制限を条件とすると、移動速度がより早くなる。SDS-PAGE電気泳動において、マクロ分子の電荷密度は、ドデシル硫酸ナトリウム（「SDS」）を系に添加することによって制御される。SDS分子は、マクロ分子と会合し、そして均一の電荷密度を、分子固有の(innate)電荷の影響を実質的になくするようにマクロ分子に与える。

【００１２】

SDS PAGEゲルは、通常、塩基性pHで注がれ、そして泳動される。タンパク質を分離するために使用される最も一般的なPAGEバッファーシステムは、Ornstein（１）によって開発されたもの、およびLaemmli（２）によってSDSとの使用のために改変されたものである。Laemmli,U.K.（1970）Nature 227,680-686。このLaemmliバッファーシステムは、分離ゲル中の、HClでpH8.8に滴定された0.375MTris（トリス（ヒドロキシメチル）アミノ－メタン）からなる。スタッキングゲル(stacking gel)は、pH6.8に滴定された、0.125MTrisからなる。アノードおよびカソード泳動バッファーは、0.024MTris、0.192Mグリシン、0.1%SDSを含む。別のバッファーシステムが、Schaeggerおよびvon Jagowによって開示されている。Schagger,H. およびvon Jagow, G., Anal. Biochem. 1987, 166, 368-379。スタッキングゲルは、HClでpH8.45に滴定された、0.75MTrisを含む。分離ゲルは、HClでpH8.45に滴定された0.9MTrisを含む。カソードバッファーは、0.1MTris、0.1Mトリシン(Tricine)、0.1%SDSを含む。アノードバッファーは、HClでpH8.9に滴定された、0.2MTrisを含む。これらのシステムの両方とも、Trisは、「共通イオン」であり、ゲル中およびアノードおよびカソードバッファー中に存在する。

【００１３】

Laemmliシステムにおいて、スタッキングゲル中のトレーリング相(trailingphase)のpHは、約8.9である。分離ゲル中において、トレーリング相のpHは、約9.7である。このpHでは、中性pHにおいてよりも、タンパク質の第１級アミノ基は、未重合アクリルアミドと容易に反応し、チオール基はより酸化を受けて、ジスルフィドとなりやすく、あるいは未重合のポリアクリルアミドとの反応をより多く受け、そしてアクリルアミド自身は加水分解を

受ける。
【００１４】
均一性および予測性の必要性は、プレキャスト電気泳動ゲル（外部の業者によって製造され、次いで電気泳動が行われる研究室に輸送される）においては大きくなる。プレキャストゲルは、上述した特性をコントロールしなければならず、そしてこれらは、輸送および貯蔵を通じてこのコントロールが保持され得なければならない。多くのプレキャストゲルの寿命は、ゲルバッファーの高pHで保存される間のアクリルアミドの加水分解についての可能性によって制限される。
【００１５】
ポリアクリルアミドゲルが加水分解により分解を受け、そして寿命が制限されるということが、高pHゲルの欠点である。
【００１６】
タンパク質が、未重合アクリルアミドと容易に反応し、そのことによりペプチド配列決定のようなタンパク質の次の分析の妨げとなり得ることも、高pHゲルのさらなる欠点である。
【００１７】
チオール基が、ジスルフィドまで酸化を受け、そのことにより分離したマクロ分子の分離能を低下させることも、高pHゲルのさらなる欠点である。
【００１８】
発明の要旨
本発明の目的は、未重合アクリルアミドとのタンパク質の反応を減らし、それにより収率および分離能を高める、中性ゲルシステムを作製することである。
【００１９】
本発明のさらなる目的は、遊離チオール基からのジスルフィドの形成を防ぎ、それにより収率および分離能を高める、中性ゲルシステムを作製することである。
【００２０】
本発明のさらなる目的は、加水分解によるポリアクリルアミドゲルの分解を減少し、それによりプレキャストゲルの有用である寿命を増加させる、中性ゲルシステムを作製することである。
【００２１】
本発明に従って、出願人は、分離が中性pHで行われ、そしてタンパク質が完全に還元されたままである、ゲルおよびバッファーシステムを記載する。本発明の上記および他の目的ならびに利点は、以下の詳細な説明を考慮することにより明らかになる。
【００２２】
発明の詳細な説明
出願人は、分離が中性pHで行われそしてタンパク質が完全に還元されたままである、ゲルおよびバッファーシステムを記載する。好都合なことに、この中性pHでは、タンパク質の第１級アミノ基は、未重合アクリルアミドと容易に反応することがより少ない。なぜなら、タンパク質のアミノ基のプロトン化は、アクリルアミドまたは他の関連したブロッキング剤に対する、これらの反応性を非常に減少させるためである。さらに、この中性pHにおいて、チオール基は、より高いpHにおいてよりも酸化を受けにくく、そしてポリアクリルアミド自身も、より加水分解を受けにくい。
【００２３】
その結果、ゲルマトリックスおよびストック溶液の改良された安定性を有するゲルシステムとなる。このシステムに従って調製されるゲルは、冷却下で１年を越える期間、アクリルアミドの加水分解に起因する性能の損失なしに、貯蔵され得る。また、還元剤を有していないストックバッファー、および重合開始剤を有していないストックゲル溶液は、少なくとも数週間、室温で、性能の損失なく貯蔵され得る。さらなる利益は、単一のゲルの手法（スタッキングおよび分離ゲルのために同じバッファーを使用する）が、２つの異なるランニングバッファーを用いて使用され、２つの分離システムが提供され得ることである

。この特徴を用いると、例えば、８％ゲルで、２～200kDaの範囲のタンパク質の分離をカバーし得る。

【００２４】

本発明の１つの実施態様において、約３％と約25％(％Ｔ)との間のアクリルアミドのポリアクリルアミドゲルは、ゲルバッファーを用いて、約１％～約６％の架橋剤（％Ｃ）を用いて重合される。このゲルバッファーは、中性近くのpKを有する第１級有機アミンまたは置換アミンを含み、約半分（モル基準で）のHClで滴定されており、その結果、該バッファーのpHがほぼ中性である。好ましい実施態様において、このゲルは、HClで滴定された、ビス-トリス[ビス-(2-ヒドロキシエチル)イミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン]を含むゲルバッファーを用いて、約２％～約５％の架橋剤（％Ｃ）を用いて重合される。異なる分離特性が、MOPS（3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸）またはMES（2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸）バッファーのいずれかを用いて、ゲルを泳動することによって得られ得る。２mM～10mMTGAまたは２mM～10mM重亜硫酸ナトリウムが、ランニングバッファーに添加され、電気泳動の際のゲルにおける還元環境を保持する。この実施態様および他の実施態様は、以下の例示および比較の実施例を参照することによって理解され得る。

【００２５】

実施例

Bis-Tris、MES、およびMOPSを、Sigma（St.Louis, MO）またはResearch Organics（Cleveland, Ohio）から購入した。チオグリコール酸（TGA）、DTT、およびメルカプトエタノール（BME）をSigmaから購入した。全ての他の薬品は、標準的な供給元からの「極めて純粋な(ultrapure)」または「電気泳動用」の試薬であった。ゲルを、Novex（San Diego CA）製の１mm厚のミニゲルカセットにキャストし、そしてNovexミニセルで流した(run)。

【００２６】

Bis-Tris分離ゲルおよびスタッキングゲルを、30％Ｔ／2.5％ＣアクリルアミドBISストック溶液および7XBis-Trisストック溶液（2.5MBis-Tris, 1.5M HCl、pH6.5）から調製した。分離ゲルを調製するために、ストック溶液を超純水とブレンドして、最終濃度を８％Ｔ、0.357MBis-Trisにし、これに0.2μl/mlテメド(temed)を添加した。脱気後、2.0μl/mlのAPSの10％溶液を添加し、ゲルをすぐにカセットに注ぎ、次いで水でオーバーレイした。重合を室温で少なくとも30分間続け、水を除去し、４％スタッキングゲルをのせた。このスタッキングゲルは、得られる最終濃度が４％Ｔであり、temed濃度を0.4μl/mlまで増加させ、そしてAPSを5.0μl/mlまで増加させたことを除いて、分離ゲルと同じ様式で調製した。

【００２７】

MOPSランニングバッファーは、50mMMOPS、50mMBis-Tris（またはTRIS）、0.1％SDS、１mM EDTAからなっていた。MESランニングバッファーは、50mM MES、50mMBis-Tris（またはTRIS）、0.1％SDS、１mM EDTAからなっていた。サンプルバッファー（2X）は、0.25MBis-Tris、0.15MHCl、10％(w/v)グリセロール、２％SDS、１mM EDTA、0.03％Serva Blue G、および200mM DTTからなっていた。タンパク質標準のセットを含有するサンプルを、適用前に15分間70度で加熱した。ウシ血清アルブミン（BSA）、鶏卵オバルブミン、アルキル化インシュリンＡおよびＢ鎖、大豆トリプシンインヒビター、およびウシ赤血球炭酸脱水酵素が、この標準に含まれていた。サンプル容量は、全ての場合において５μlであった。

【００２８】

実施例１

タンパク質標準を、還元剤の非存在下でMOPSランニングバッファーを用いて８％Bis-Trisゲル上で分離した。得られた分離パターンは、追跡用色素とともにスタック（stack）中に残っているタンパク質20,000およびそれより小さい残存物について、８％TRIS/グリシンゲル（Laemmli）上で得られたものと非常に類似していた。BSAバンドはいくぶん拡散し、そしてアノードの方にシフトした。オバルブミンのバンドもまた、いくぶん拡散した。

【００２９】

実施例２

タンパク質標準を、カソードバッファー中のTGAの存在下、MOPSランニングバッファーを用いて８％Bis-Trisゲル上で分離した。これについても、分離パターンは、追跡用色素とともにスタック中に残っているタンパク質20,000およびそれより小さな残存物について、８％TRIS/グリシンゲル（Laemmli）上で得られたものと非常に類似していた。カソードバッファー中、還元剤である５mMTGAの存在により、タンパク質BSAおよびオバルブミンのより良好な分離が、TGAなしのゲル泳動と比較して提供された。

【００３０】

実施例３

タンパク質標準を、カソードバッファー中の重亜硫酸ナトリウムの存在下、MOPSランニングバッファーを用いて８％Bis-Trisゲル上で分離した。これについても、分離パターンは、追跡用色素とともにスタック中に残っているタンパク質20,000およびそれより小さな残存物について、８％TRIS/グリシンゲル（Laemmli）上で得られたものと非常に類似していた。カソードバッファー中、還元剤である５mM重亜硫酸ナトリウムの存在により、タンパク質BSAおよびオバルブミンのより良好な分離が、重亜硫酸ナトリウムなしのゲル泳動と比較して提供された。

【００３１】

実施例４

タンパク質標準を、還元剤の非存在下でMESランニングバッファーを用いて８％Bis-Trisゲル上で分離した。タンパク質の分離は、12%TRIS/トリシン（Schaegger）ゲルから得られたものと非常に類似していた。全てのタンパク質は、インシュリンＡおよびＢ鎖（それぞれ、3500および2500ダルトン）を含むスタックから分かれた。ゲルをTGAなしで泳動する場合には、大豆トリプシンインヒビターは、より目立ったダブレットを有していた。

【００３２】

実施例５

タンパク質標準を、カソードバッファー中のTGAの存在下で、Bis-Tris/MESランニングバッファーを用いて８％Bis-Tris/Clゲル上で分離した。これについても、全てのタンパク質は、インシュリンＡおよびＢ鎖（それぞれ、3500および2500ダルトン）を含むスタックから分かれた。カソードバッファー中の還元剤である５mMTGAの存在により、タンパク質大豆トリプシンインヒビターのより良好な分離が提供された。炭酸脱水酵素は、試験された全ての条件下で、引き締まって鋭いバンドとして泳動した。

【００３３】

実施例６

タンパク質標準を、カソードバッファー中の重亜硫酸ナトリウムの存在下で、Bis-Tris/MESランニングバッファーを用いて８％Bis-Tris/Clゲル上で分離した。これについても、全てのタンパク質は、インシュリンＡおよびＢ鎖（それぞれ、3500および2500ダルトン）を含むスタックから分かれた。カソードバッファー中の還元剤である５mM重亜硫酸ナトリウムの存在により、タンパク質大豆トリプシンインヒビターのより良好な分離が提供された。炭酸脱水酵素は、試験された全ての条件下で、引き締まって鋭いバンドとして泳動した。

【００３４】

得られるシステムは通常使用されるLaemmliおよびSchaeggerゲルシステムに類似した分離特性を有しているので、MESおよびMOPSが望ましいランニングバッファーとして選択されるが、所定の範囲のバッファーは、このシステムの使用に適切であるということが見出された。良好な結果を提供するさらなるバッファーには、ACES（[N-(2-アセトアミド)]-2-アミノエタンスルホン酸）、MOPSO（2-[N-モルホリノ]-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）、TES（N-トリス-(ヒドロキシメチル)-2-エタンスルホン酸）、BES（N,N-ビス-(ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸）、HEPES（N-2-ヒドロキシエチル-ピペラジン-n-2-エタンスルホン酸）、TAPSO（3-(N-トリス-(ヒドロキシメチル)メチルアミノ)-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）がある。

【００３５】

TGAも重亜硫酸ナトリウムも存在しない泳動の場合にバンドのブローディングおよび／または移動度のシフトをいくらか示す全てのタンパク質は、共通して、複数のシステイン（例えば、BSAは35個のシステインを有する）を含む組成を有する。一方、いつもきれいに泳動する炭酸脱水酵素は、システインを有していない。さらに、還元されたタンパク質が泳動前にアルキル化される場合にも、これらは、還元剤の非存在下でさえ鋭い均一なバンドとして泳動する。

【００３６】

システイン含有タンパク質は、サンプルバッファー中に100mMメルカプトエタノールまたはDTTを含むがランニングバッファー中にTGAを含まないものを用いて泳動した場合には、一般に中性のシステムよりもLaemmliシステムにおいて、より鋭いバンドとなるようである。pHが増加するにつれてチオールがより酸化されやすくなるので、pHのより高いLaemmliシステムでは、少なくとも中性pHシステムにおいて言われているのと同じぐらいにはジスルフィドの酸化が起こることが予測され得る。しかし、DTTおよび類似の「中性」チオール還元剤は、弱酸（pKaは約pH８～９）である。従って、塩基性pHでは、これらの還元剤はゲル中に移動し、そして十分な濃度で存在する場合には、スルフヒドリルの酸化に対していくらかの保護を提供する。中性の分離pHにおいては、サンプルバッファーからのDTTは荷電していない形態であり、そしてサンプルウェル中に残る。従って、還元剤はゲル中に移動しない。

【００３７】

中性pHでの電気泳動の際にタンパク質の還元形態を保持するためには、中性pHでゲル中に移動する還元剤を使用することが有利であることが見出された。重亜硫酸ナトリウム（２～10mM）が、電気泳動の際にゲル中の還元環境を保持することが見出された。十分に還元されたTGA（または同様に負に荷電したチオール）も、同様の濃度で同様の結果を与える。しかし、部分酸化されたTGAは、タンパク質チオールの部分酸化を促進する。タンパク質チオールの還元（酸化）はジスルフィド交換により起こるので、該タンパク質中における還元チオールの酸化チオールに対する比は、実質的に、TGA中の還元チオールの酸化チオールに対する比を反映する。反対に、スルファイトは、スルフェートまで酸化し、ゲルにおいて見られる条件下での酸化還元反応には参加しない。それゆえ、スルファイトの部分酸化生成体におけるスルファイト／スルフェート比にかかわらず、十分なスルファイトが残存する限り、タンパク質はチオール酸化に対して保護される。

【００３８】

TRISが、分離の品質において明らかな影響を及ぼすことなく、ランニングバッファー中のBis-Trisの代わりとなり得ることがまた見出された。タンパク質を意図的に分離後に改変する場合には、Bis-Trisが好適であり得る。Bis-Trisは第３級アミンであり、そして第１級アミンと反応するタンパク質改変剤とは干渉しない。しかし、TRISが、ルーチンの使用には好ましい選択である。なぜなら、Bis-Trisよりも明らかに低い費用で入手可能であるからである。

【００３９】

本発明を好ましい実施態様について説明したきたが、それらの種々の改変は当業者にとっては明らかであることが理解されるべきである。上記の開示は、本発明を限定するようには意図または解釈されず、またはそうでなくとも、あらゆる上記の他の実施態様、適用、変形、および等価の改変を排除するようにも意図または解釈されず、本発明は、ここに添付した請求の範囲およびそれらの等価のものによってのみ限定される。

フロントページの続き

(72)発明者　アプダイク，　ティモシー　ブイ.
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９２５９２，　テメクラ，アベニダ　チャパラ　３７３４９

審査官　黒田　浩一

(56)参考文献　特開平０４－１８４１６３（ＪＰ，Ａ）
特表平０５－５０５８７７（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０４４８１０９４（ＵＳ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.[7]，ＤＢ名)
G01N 27/447
B01D 57/02
JICSTファイル(JOIS)