



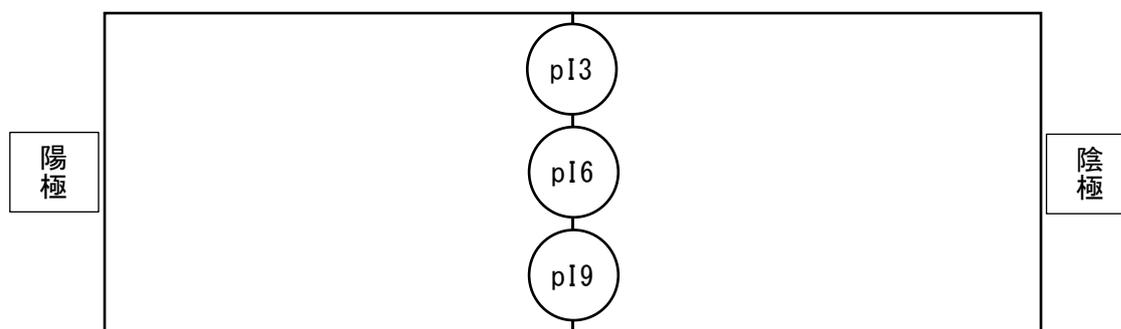
## II.電気泳動法



### 1 電気泳動法の原理

電気泳動法は、溶液中の電荷のある物質が直流電圧をかけた電場のもとで移動することを利用した分離法である。このとき、負の電荷を有する物質は陽極へ、正の電荷を有する物質は陰極へ泳動し、移動度や泳動速度の差により分離が行われる。タンパク質や核酸、多糖類など電荷のある物質の分離に利用される。

・ アミノ酸の分離 (pH6 の緩衝液中)



### 2 泳動速度

電荷をもつ物質の移動速度は、電荷の大きさ、イオン半径、電圧の大きさなど様々な影響を受ける。電気泳動移動速度は以下の式で表すことができる。

$$v = \mu E = \left( \frac{Q}{6\pi\eta r} \right) \left( \frac{V}{L} \right)$$

$\mu$  : 移動度、 $E$  : 電場 (単位距離当たりの電圧)  
 $Q$  : イオンの実効電荷、 $r$  : イオンの半径  
 $\eta$  : イオンが移動する溶媒の粘度、 $V$  : 電圧  
 $L$  : 電極間の距離

	移動速度との関係
イオンの実効電荷 ( $Q$ )	比例
電場又は電圧 ( $E$ 又は $V$ )	比例
イオンの半径 ( $r$ )	反比例
溶媒の粘度 ( $\eta$ )	反比例
電極間の距離 ( $L$ )	反比例

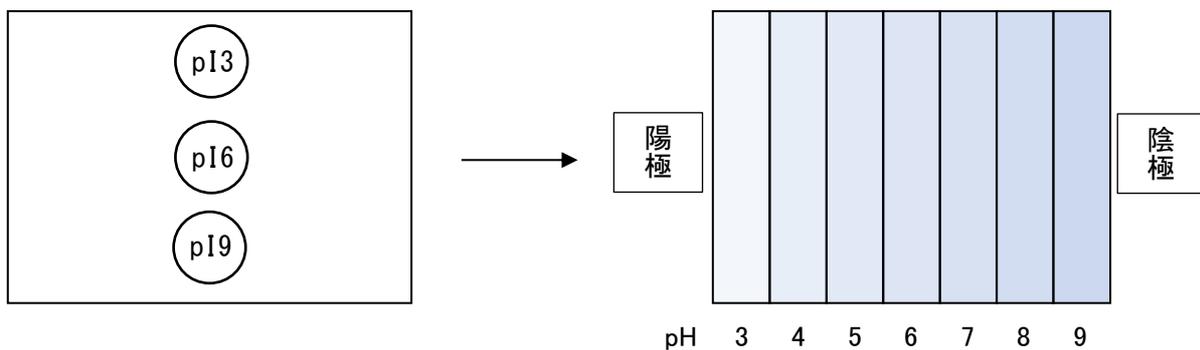
### 3 分類

総称	名称	特徴
ゾーン電気泳動法	等電点電気泳動法	電極間に pH 勾配を形成させ、等電点の異なる物質を電荷の違いにより分離する。
	SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)	タンパク質に 2-メルカプトエタノールと SDS を加えて負に帯電させた後、ポリアクリルアミドゲルを用いて分子の大きさで分離する。
	アガロースゲル電気泳動法	負の電荷をもつ核酸 (DNA、RNA) をアガロースゲルで分子の大きさにより分離する。
キャピラリー電気泳動法	キャピラリーゾーン電気泳動法	電気浸透流を利用して、物質の電荷と分子量の違いにより分離する。
	ミセル動電クロマトグラフィー	SDS を添加した緩衝液を用いて、電気浸透流を利用し分配係数の差により分離する。
	キャピラリーゲル電気泳動法	ゲルを用いた分子ふるい効果により分子の大きさで分離する。 (本法はゲルにより、電気浸透流が抑えられる。)
	キャピラリー等電点電気泳動法	緩衝液に両性電解質 (ポリアミノカルボン酸など) を溶解し、pH 勾配を形成させて分離する。

### 4 ゾーン電気泳動法の分離機構

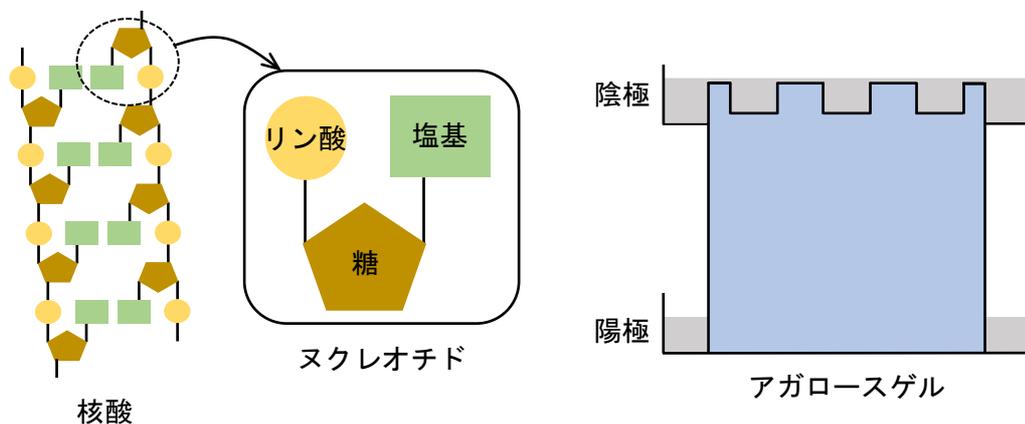
#### 1) 等電点電気泳動法

等電点電気泳動法は、pH 勾配を利用して等電点の異なるタンパク質やアミノ酸を電荷の違いにより分離する方法である。



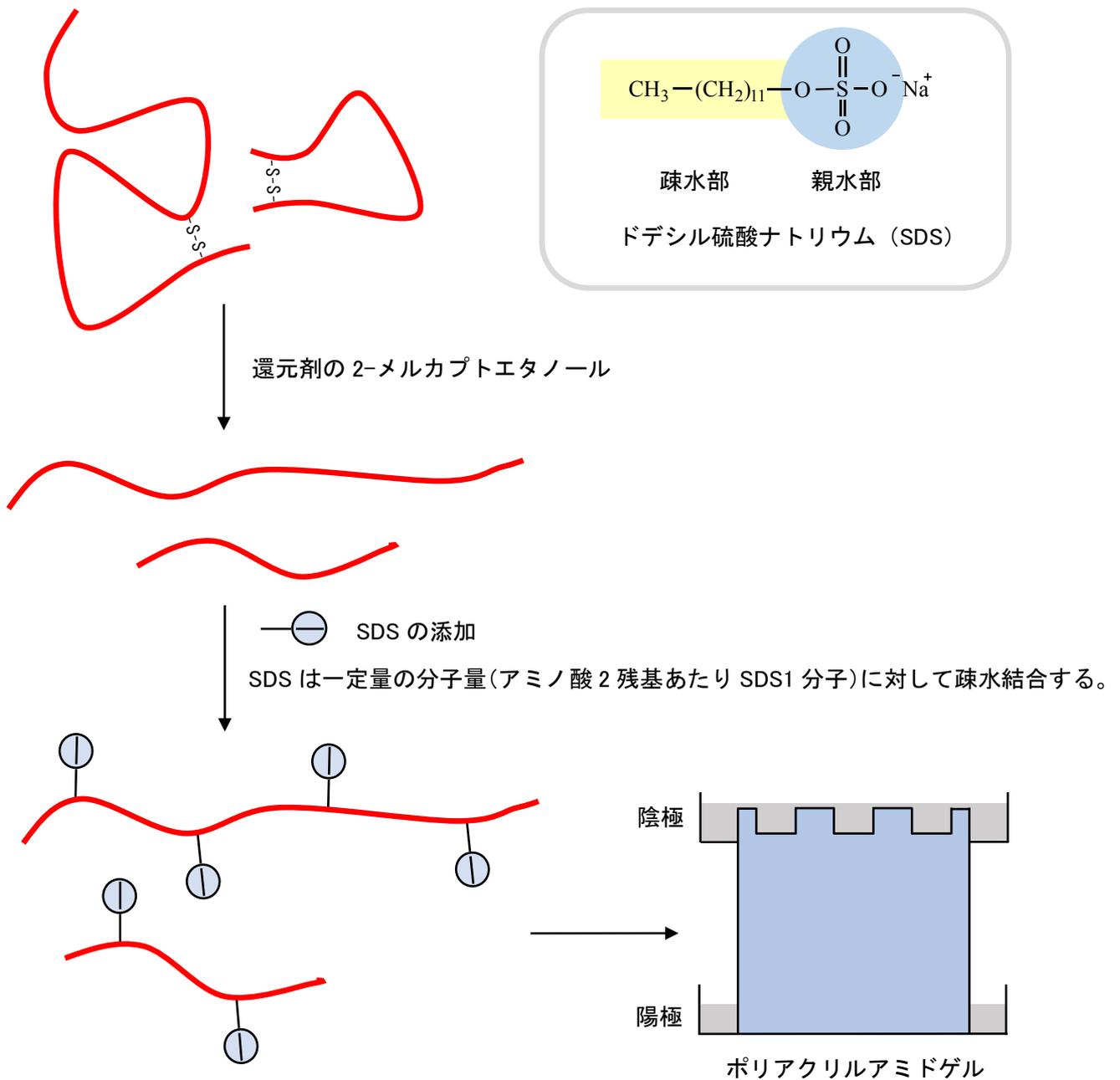
## 2) アガロースゲル電気泳動法

アガロースゲル電気泳動法は、分子ふるい効果を利用した核酸の分離法であり、分子量測定に利用される。負の電荷を持った核酸は、陽極に向かって泳動するが、小さな核酸分子ほど速く移動し、大きな核酸分子ほど遅く移動する。核酸は1塩基あたりのリン酸基の数は同じことから、単位電荷当たりの質量はほぼ等しくなるため、アガロースゲルによって分子サイズの違いで分離が可能となる。また、分離された核酸の検出は、臭化エチジウム（エチジウムブロマイド）が用いられる。



### 3) SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE は、分子ふるい効果を利用したタンパク質の分離法であり、分子量測定に利用される。タンパク質に還元剤の 2-メルカプトエタノールを添加して S-S 結合 (ジスルフィド結合) を切断した後、陰イオン性界面活性剤のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を加え、タンパク質を一様に負で帯電させる。負に帯電したタンパク質は陽極に向かって泳動するが、小さなタンパク質ほど速く移動し、大きなタンパク質ほど遅く移動する。また、分離されたタンパク質の検出は、クマシー染色や銀染色が行われる。



#### 4) 二次元電気泳動法

二次元電気泳動は、等電点電気泳動と SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を組み合わせたもので、ある生体試料中の多種多様なタンパク質をそれぞれ固有の等電点と分子量の違いを利用して分離する方法である。本法は分離能が高いため、生体内のタンパク質を一斉に分析するプロテオーム解析に利用される。以下は、二次元電気泳動の概要と実験結果を示したものである。

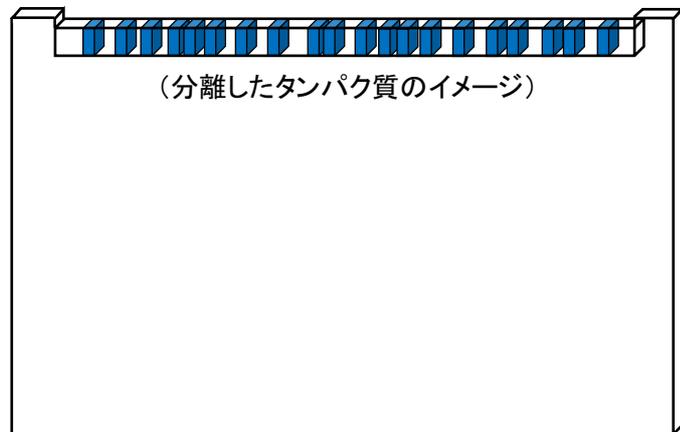
##### ① 一次元目 (等電点電気泳動)

pH 勾配を形成させた棒状のゲルを準備する。このゲルを用いて電気泳動すると、試料中の各タンパク質はそれぞれの等電点の位置まで移動する。



一次元目の電気泳動後  
(等電点電気泳動)

※実際にはこの段階では染色していないため、あくまで分離したタンパク質のイメージである。

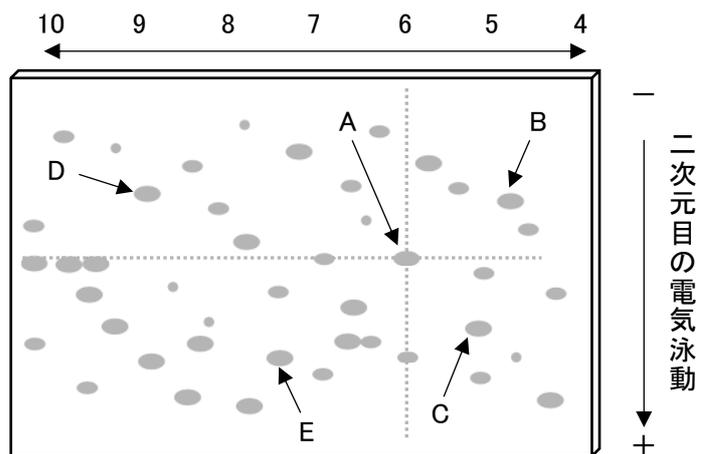


##### ② 二次元目 (SDS-PAGE)

等電点電気泳動により試料中のタンパク質を分離した棒状ゲルを、SDS-PAGEの分離ゲルの上に移し、一次元目の等電点電気泳動と直角の方向に電気泳動する。タンパク質は、その分子量に応じた位置まで移動する。

電気泳動の終了後、泳動用のガラス板から取り出したゲルを洗浄し、クマシーブリアントブルーでタンパク質を染色する。

二次元目の電気泳動  
(SDS-PAGE)



・スポット A のタンパク質 (pI 6、Mw:60000) との比較

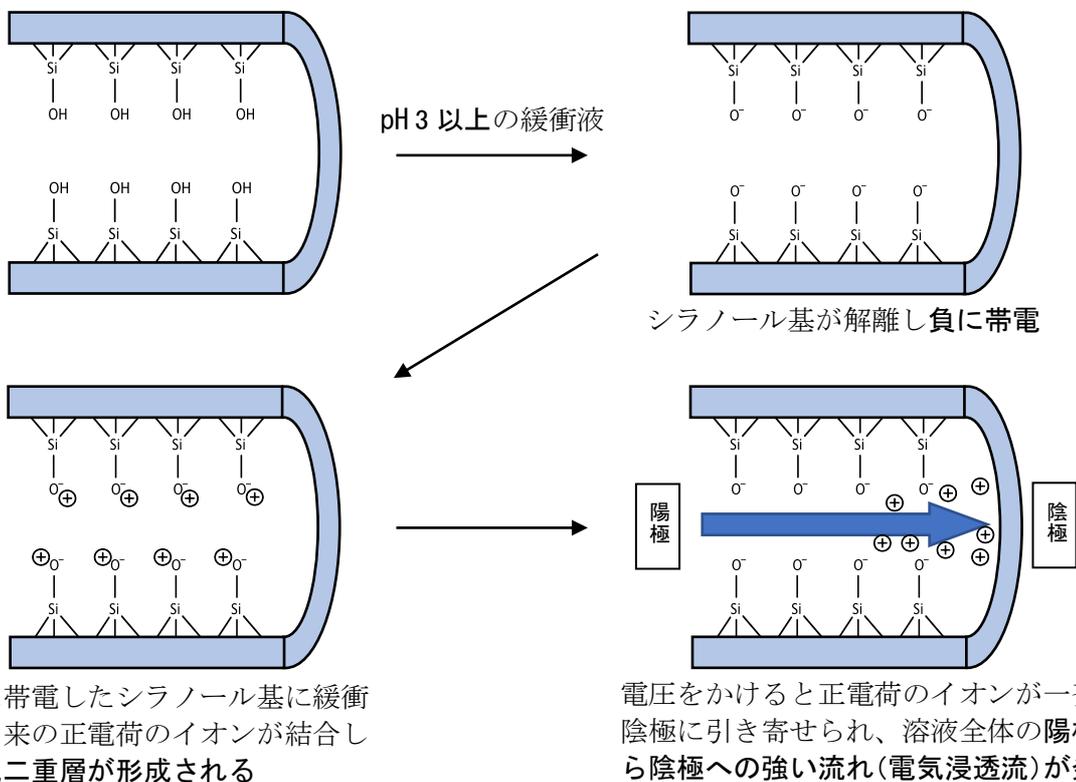
スポット	等電点 (pI)	分子量
B	A より小さい	A より移動度が小さいため、分子量は大きい
C	A より小さい	A より移動度が大きいため、分子量は小さい
D	A より大きい	A より移動度が小さいため、分子量は大きい
E	A より大きい	A より移動度が大きいため、分子量は小さい

## 5 キャピラリー電気泳動法の分離機構

キャピラリー電気泳動は、内径 100  $\mu\text{m}$  以下のフューズドシリカ製キャピラリー内に緩衝液を満たした後、極微量の試料を加えてから両端に電圧をかけ、電気泳動を行う分離法である。キャピラリーは極めて細いため、内部の試料の拡散は少なく、高い分離能が得られる。また、キャピラリー自体を検出セルとして紫外可視吸光度計や蛍光光度計と組み合わせて用いることができる。本法では、主にキャピラリー内で発生する電気浸透流を利用して分離する。以下、電気浸透流の概要である。

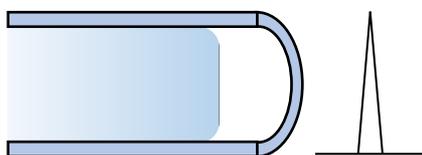
### ・電気浸透流 (EOF)

キャピラリーに、pH3 以上の緩衝液を満たすと内壁のシラノール基が解離し、負に帯電する。そこに緩衝液中の正電荷のイオンが結合することにより電気二重層を形成する。ここでキャピラリーの両端に電圧をかけると内壁に結合した正電荷のイオンが一斉に陰極に引き寄せられ、溶液全体の陽極から陰極方向に強い流れができる。この現象を電気浸透流という。なお、電気浸透流は、キャピラリー内の泳動液の pH が高いほど強くなる。なお、ろ紙などの支持体を用いても弱い電気浸透流は発生するが、分離には利用できない。

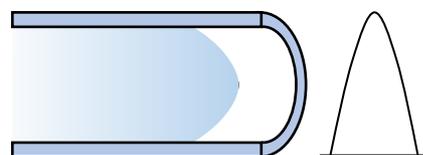


キャピラリー内での電気浸透流の流れは内壁から中心に向かってほぼ一定で平面的な栓流となっているこれにより試料の拡散が少なく鋭いピーク(高い分離能)が得られる。一方、ポンプで送液する高速液体クロマトグラフィー(HPLC)では放物線流(層流)となり、ピークが広がる(分離能が悪い)。

### ・キャピラリー電気泳動



### ・高速液体クロマトグラフィー(HPLC)

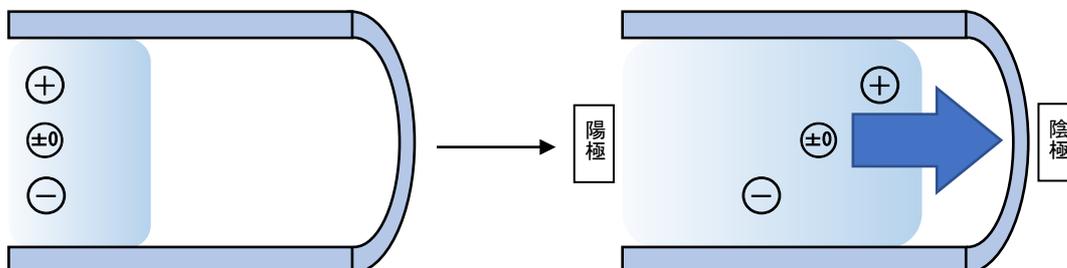


## 1) キャピラリーゾーン電気泳動法

キャピラリーゾーン電気泳動法は、電気浸透流を利用したイオン性物質の相互分離を行う方法である。イオンの電荷とイオンの大きさに依存して分離する方法であり、中性物質相互の分離はできない。

- ・陽イオン性物質、中性物質、陰イオン性物質の分離

pH3 以上の緩衝液で満たす



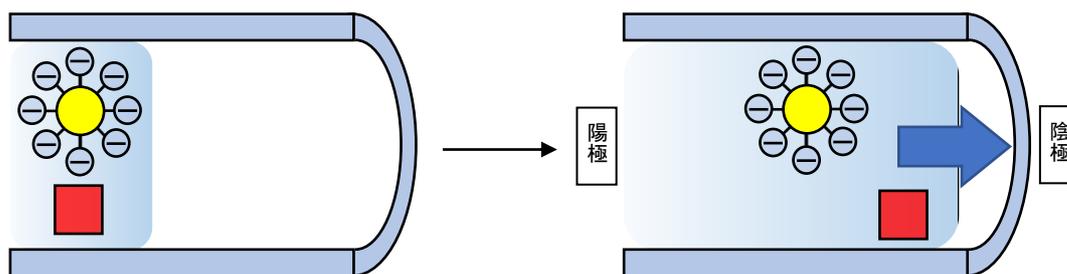
陽イオン性物質	電気浸透流と泳動方向が同じため、最も速く移動する。
中性物質	電気浸透流と同じ速度で移動する。
陰イオン性物質	電気浸透流と泳動方向が異なるため最も遅く移動する。

## 2) ミセル動電クロマトグラフィー

ミセル動電クロマトグラフィーは、電気浸透流を利用した分離法である。緩衝液中にイオン性界面活性剤の SDS を添加することで、分配係数の差からイオン性物質だけでなく、中性物質の相互分離が行える。

- ・疎水性が大きい中性物質 (●) と疎水性が小さい中性物質 (■) の分離

SDS (⊖) を添加した pH3 以上の緩衝液で満たす



疎水性が大きい物質	SDS と結合しやすいため、陽極方向へ泳動する力が強く、陰極方向へ遅く移動する。
疎水性が小さい物質	SDS と結合しにくいいため、陽極方向へ泳動する力が弱く、陰極方向へ速く移動する。

### 3) キャピラリーゲル電気泳動法

キャピラリーゲル電気泳動法は、分子ふるい効果を利用した DNA やタンパク質などの生体高分子の分離法である。本法はゲルにより電気浸透流が抑制される。DNA のような負電荷を持つものは、泳動により陽極に泳動し、ヒストンのような正電荷を持つ塩基性タンパク質は、泳動により陰極方向に泳動する。

#### ・ DNA の分離

