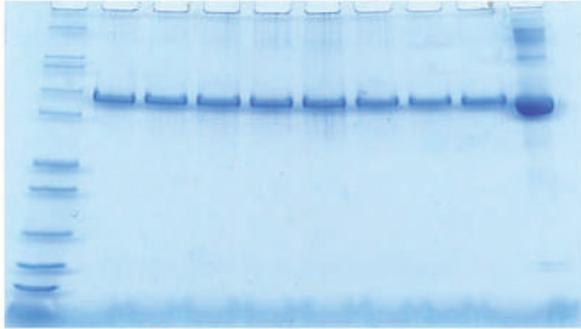


GELFREE 8100 Fractionation System よくある質問

- Q** GELFREE 8100 Fraction System は何を行うものですか？
- A** 複合タンパクの分子ふるいによる分取システムです。
1D ゲル電気泳動に似ていますが、回収率が高いことが特徴です。
タンパクが完全な状態で回収できるので翻訳後修飾解析に有利です。
- Q** 等電点や疎水性の影響を受けますか？
- A** いいえ。分子量による振り分けなので pI や疎水性の影響を受けません。
- Q** どのような buffer ですか？
- A** 独自の HEPES-SDS buffer を使用しています。Buffer の pH は pH7.8 です。
- Q** Sample buffer と Running buffer に SDS は含まれていますか？
- A** どちらにも SDS が含まれます。
- Q** どのようなゲルですか？
- A** GELFREE 8100 Fractionation System では、独自のポリアクリルアミドゲルを採用しており、分解能、再現性、ロバスト性が最大限に発揮できます。
- Q** Gelfree Cartridge は繰り返し使用可能ですか？
- A** 1回使い切りです。カートリッジは 8 チャンネルで構成されていますが、未使用分を後日使うことは可能です。
- Q** GELFREE 8100 Fraction System における分子ふるいクロマトグラフィーの利点は？
- A** 広い Mass Range、高い回収率、高分解能であることが挙げられます。
またマルチチャンネルでの同時処理が可能なので 2DLC 不要、
LC システム以外の他のアプリケーションへの切り替え不要です。
- Q** GELFREE 8100 Fraction System のスループットはどのくらいですか？
- A** 8 サンプル同時に処理が可能で、Mass Range は 3.5-500kDa です。
低分子であれば数分、複数のレンジ、高分子がターゲットの場合は溶出に時間がかかります。
泳動時間、サンプル回収作業含めて 2-3 時間で終了します。
- Q** 分取可能な分子量範囲はどのくらいですか？
- A** 3.5-500kDa です。
- Q** 回収率はどのくらいですか？
- A** アルブミン (MW; 66kDa) で 64% です。

Q 再現性はどのくらいですか？

A アルブミンで実施した結果、n=8 で回収率の CV 値が 8.4% です。



Protein recoveries and reproducibility of recovery as calculated from gel image analysis data produced using QuantityOne software(Bio-Rad).

column	% Adj. Vol.	% Recovery
1.0	10.3	62.6
2.0	10.4	63.5
3.0	10.8	66.0
4.0	11.8	71.9
5.0	11.1	67.8
6.0	9.0	54.7
7.0	9.6	58.6
8.0	10.5	64.0
Control	16.4	

Average	SD	% CV
63.6	5.3	8.4

Q 分解能はどのくらいですか？

A 分解能は分子量のおよそ 10% です。
各分画の質量幅は 50kDa であれば、およそ 7-10kDa となります。

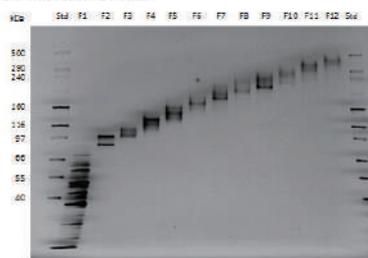
Q 最適なカートリッジを選ぶにはどうしたらよいですか？

- A**
- ① 目的タンパク質が決まっている場合、目的タンパク質の分子量が中心に来るようなカートリッジを選択する、つまり Quick Reference Card で 6 分画目あたりに溶出されるカートリッジを選択します。
 - ② Unknown sample の場合、1D gel 泳動で展開させ参考にした上で、カートリッジを決定します。
 - ③ 複数のカートリッジを併用することも可能です。

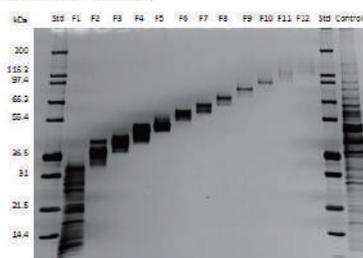
参考) カートリッジ仕様

% Polyacrylamide	MW Range	Optimum MW Range	Average Fraction Width
5%	3.5 – 500 kDa	75 – 500 kDa	40 kDa
8%	3.5 – 150 kDa	35 – 150 kDa	10 kDa
10%	3.5 – 100 kDa	15 – 100 kDa	7 kDa
12%	3.5 – 60 kDa	10 – 50 kDa	4 kDa

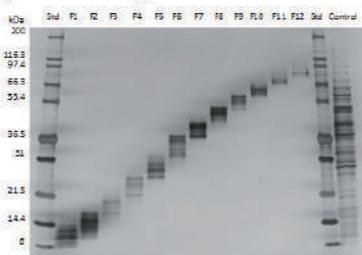
a) 5% cartridge



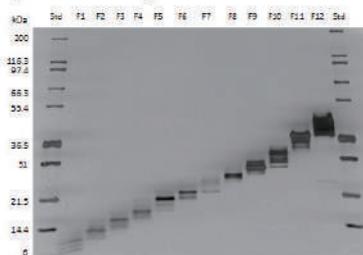
b) 8% cartridge



c) 10% cartridge



d) 12% cartridge



Fractionation of yeast, *S. cerevisiae*, demonstrated using the four different Gelfree 8100 cartridges.

A 0.5 mg aliquot of yeast was separated into 12 different fractions using each of the four cartridge types. The resulting fractions were analyzed using tris-glycine 1D gels and visualized with silver staining.

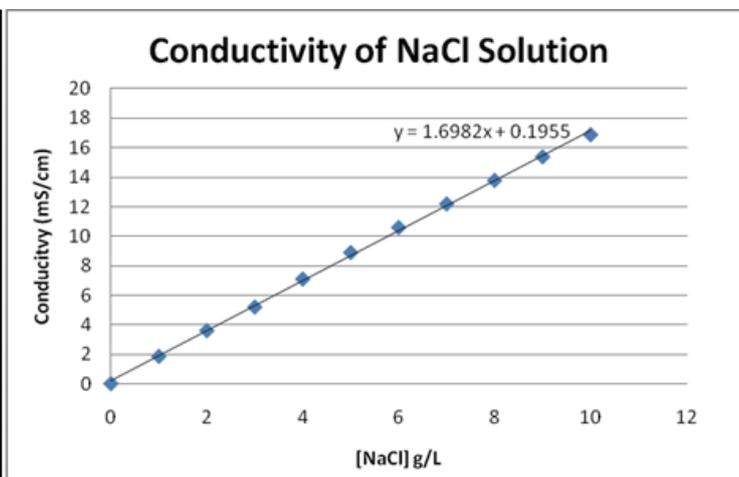
Q サンプル調製の際に、Sample buf.(5x) と還元剤を加えるだけで良いのですか？
可溶化、脱塩の必要性はありますか？

A 可溶化と脱塩操作を行う方が良いです。
サンプル可溶化には、UPX Universal Protein Extraction Kit の使用を推奨します。
UPX Kit は GELFREE 8100 Fractionation System との相性が良く、分画や解析に十分なタンパク量を得ることができます。また、脱塩操作をすることでサンプル間の分離差を軽減できます。
塩濃度が高い、もしくは伝導性が高いと電圧低下を引き起こし、泳動の遅れ、分離の悪さにつながります。脱塩の必要がない濃度の際にも、脱塩処理をすることでサンプルの伝導性が一定になり再現性が良くなります。

Q サンプルに含まれる塩の許容濃度はどのくらいですか？

A Quick Reference Card と同様の分離を得るためには、伝導率 <2mS/cm が推奨です。
NaCl 換算では 20mM に相当します。脱塩操作を行うとサンプル間の伝導率の差がなくなるので、再現性が良くなります。脱塩後の伝導率は <1mS/cm です。伝導率 >2mM のサンプルでは、泳動が遅くなり、Quick Reference Card と同じ分離は得られなくなります。

mass of NaCl (g/L)	Molarity (mM)	Conductivity (mS/cm)
0	0	0
1	17	1.85
2	34	3.6
3	51	5.2
4	68	7.1
5	86	8.9
6	103	10.6
7	120	12.2
8	137	13.8
9	154	15.4
10	171	16.9



Q 細胞を GELFREE 8100 Fraction System に供するにはどうすればよいですか？

A 細胞培養には無血清培地を使用します。(アルブミンのコンタミを防ぐため)
細胞からのタンパク抽出には、UPX Universal Protein Extraction Kit を推奨します。
GELFREE 8100 Fractionation System との相性が良く、他の可溶化試薬より優れています。
Cell 数の規定はありません。ペレットの重量で判断します。さまざまな細胞に使用可能です。

Q アプライ出来るボリュームはどのくらいですか？

A サンプル量は 1-112uL です。アプライ量はトータルで 150uL です。

Q 最大処理量はどのくらいですか？

A サンプルに依存しますが、0.5ug-5mg までアプライ可能です。通常は 250ug までを推奨します。

Q 最大処理量を超えるとどうなりますか？

A オーバーロードすると、分離が悪くなります。
負荷量は処理するサンプルに依存しますが最大 250ug を推奨します。

Q サンプルに含まれる sucrose, glycerol の許容濃度はどのくらいですか？

A どちらも極力低濃度をお勧めします。1-2%以内に抑える必要があります。
サンプルが sample loading chamber で沈んでしまうためです。

Q 1D SDS-PAGE で使用するサンプルバッファーを使うことはできますか？

A いいえ。GELFREE 8100 Fraction System の Sample buffer は SDS-PAGE 用の Sample buffer とは違いサンプル濃度、密度を上げる試薬 (スクロース、グリセロール等) を使用していません。SDS-PAGE 用 Sample buffer を使用すると、サンプルが sample loading chamber に沈みます。泳動すると、サンプルはゲル下部を移動します。泳動時間や分離に影響が出る恐れがあります。

Q 使用しないレーンはどのように保存しますか？

A 使用するチャンネル→User Manual に沿って操作します。
使用しないチャンネル→Storage buffer はそのまま、電圧はかけないようにします。
使用後のレーンはバッファーを除き、カートリッジにシールをして室温保存です。

Q チャンネルごとに違うメソッドを実施することは可能ですか？

A いいえ。GELFREE 8100 Fractionation System では、一度に単一メソッドしかランできません。

Q 誤ったチャンネルに電圧をかけた場合、そのチャンネルは使用不可ですか？

A Storage buffer が満たされたレーンに電圧をかけた場合、短時間であれば使用可能です。
Running buffer が満たされたレーンに電圧をかけた場合、Running buffer がゲルに拡散するので再使用できなくなります。

Q 装置にかけられる最大電圧 (推奨) はどのくらいですか？

A 推奨範囲は 50-100V です。推奨範囲を超えると、温度の影響が出やすくなり再現性が低下します。

Q Step 1 での sample loading chamber の洗いは必要ですか？

A 洗いを推奨しているのは、sample loading chamber の壁面に、タンパク質が残っている恐れがあるからです。特に多量のタンパク質がサンプルに含まれる場合、数フラクションにオーバーラップして出てくることがあります。これらを回避するために、チャンバーを洗います。

Q どのくらい分取できますか？

A 30 フラクションまでです。
メソッドにより単一タンパクを分取、または複数タンパク質をまとめて回収できます。

Q フラクションのボリュームはどのくらいですか？

A 150-200uL です。

Q フラクションの最小量はどのくらいですか？

A 150uL です。150uL 以下にしたい場合は、回収後サンプルを遠心エバポレーター等で濃縮します。濃縮作業をすると、SDS、Tris の濃度も上がりますので注意が必要です。

Q 高分子のタンパクの分離はどうでしょうか？

A GELFREE 8100 Fractionation System は特に高分子タンパクの拡散を防ぐデザインです。500kDa まで分画可能です。

Q カートリッジの質量範囲より大きいタンパク質はどうなりますか？

A Resolving gel に残り回収できません。
Quick Reference Card のメソッドに泳動時間を追加すると回収出来る可能性はあります。

Q 3.5kDa 以下のタンパク質はどうなりますか？

A sample collection chamber を通り抜けてしまい、回収できません。



回収したフラクションに含まれる SDS はどの程度ですか？

A 1 分画目の SDS 濃度はおよそ 0.1% です。Sample buffer の影響を受けるため、他のフラクションより濃くなります。



回収したフラクションの保存方法はどのようにしますか？

A 一昼夜であれば 4℃ 保存、24 時間以上の場合は -80℃ 保存をお勧めします。



TCA 沈殿サンプルのような再溶解の難しいサンプルを溶解するにはどうしたらよいですか？

A ペレットに 30ul Sample buffer、8ul 1M DTT を加え、溶解後 112ul の水を加えます。ペレットの一部を GELFREE 8100 Fractionation System に供する場合は、10mM Tris acetate buffer で溶解しその一部を sample preparation に使用します。



膜タンパクを溶解するにはどうしたらよいですか？

A 2.5% SDS、50mM Tris pH8.2 で溶解した後に、Sample buffer を加えます。



SDS 除去をするにはどうしたらよいですか？

A SDS 除去キットは多数ありますが、Thermo Pierce のスピнкаラムが使いやすく高回収率です。



脱塩をするにはどうしたらよいですか？

A 塩が含まれると、移動性・再現性に影響します。Pierce Zeba Spin Desalting Column を推奨します。



回収したフラクションの処理はどうしたらよいですか？

A インタクトタンパクの分析の場合は SDS 除去、他は Filter Aided Sample Prep (FASP) method を推奨します。



GELFREE 8100 Fraction System のフラクションを 1D SDS-PAGE へ供するにはどうしたらよいですか？

A Invitrogen のゲル (12% カートリッジ ; 4-12% Tris-glycine gel、他カートリッジ ; 10-20% Tris-glycine gel) を使用した場合の処理例です、他メーカーの物でも同様です。

5uL GELFREE fraction

+ 8uL water

+ 5uL LDS sample buffer

+ 2uL 1M DTT

total 20uL

50℃で 10 分間処理し、ゲルには 10uL アプライします。泳動後は、銀染色で確認します。



他のレーンよりも泳動が遅くなるのはなぜでしょうか？

A 気泡、カートリッジ温度、塩濃度、サンプル粘度、サンプル量のいずれかによります。気泡が membrane(sample loading chamber と buffer reservoir を仕切る) にトラップされると他のレーンよりも電流値が低くなり、泳動が遅れます。泡立てないように、ゆっくりと操作するようにします。気泡がある場合はピペット等で取り除きます。カートリッジやバッファの温度が室温よりも低い場合、泳動が遅れる恐れがあります。カートリッジ、バッファ類は室温保存し、冷蔵、冷凍保存はしません。塩濃度が高い場合、泳動が遅れる傾向にあります。詳しくは塩の許容濃度 (p. 3) をご参照願います。サンプルの粘度が高い場合、量が多すぎる場合は処理量を減らした上での検討が必要です。