



一般研究用キット

Mucin Membrane Electrophoresis Kit

ムチン膜電気泳動キット

Cat. No. SMME-01

2019年10月30日作成

www.cosmobio.co.jp

【1-1】背景

ムチンは上皮細胞などが産生する高粘性の糖タンパク質群であり、その糖鎖構造の変化は古くから腫瘍との関連性が報告されてきました。しかしながら、ムチンは数 MDa にも及ぶ巨大タンパク質であり、また、その 50～80% を占める糖鎖がプロテアーゼ分解を阻むため、プロテオミクスではなかなか分析できません。

本キットが採用する分子マトリクス電気泳動法 (Supported Molecular Matrix Electrophoresis = SMME) は、多孔性ポリマー膜に含浸させた親水性ポリマーを分離担体とする膜電気泳動であり、セルロースアセテート (セ・ア) 膜電気泳動に類似した方法です。セ・ア膜電気泳動と違い化学的に極めて安定で疎水結合力の強い PVDF を用いているため、化学的糖鎖遊離処理において糖鎖分析を妨害する物質 (セルロース由来のグルコース断片など) を生じないことや、泳動後の膜上に存在するタンパク質を別の膜に転写することなく抗体やレクチン等で染色することが可能であることが特徴です。

本キットを用いて、疾患バイオマーカー探索やムチンをターゲットとした研究が可能です。

※本製品は、国立研究開発法人産業技術総合研究所の研究成果を活用しています (特許第 5152862 号)



【1-2】キット構成

保存温度：4℃

内容	サイズ	数量	保存温度	取扱上の注意
親水性ポリマーコーティング PVDF 膜	8.0 x 8.5 cm	10 枚	室温	取扱う際には眼鏡・手袋などの保護具を着用の上、人体の接触を避けるよう十分に配慮してください。
ろ紙	8.0 x 8.5 cm	20 枚		
泳動用バッファー	500 mL	1 本		
電気泳動マーカー	0.5 mL	1 本	4℃	
酢酸 Na バッファー	200 mL	1 本	室温	
アルシアンブルー染色原液	50 mL	1 本		

別途ご準備いただくもの

- 膜電気泳動槽セット (品番: SMME-02)
- パワーサプライ (1 ~ 10 mA 定電流運転時、100 ~ 135V で稼働可能なもの)
- メタノール
- 酢酸
- 精製水

【II】試薬の調製方法

- 固定液: 酢酸 30 mL、メタノール 70 mL の比率で混合してください (用時調製)。
- アルシアンブルー染色液: アルシアンブルー染色原液 10 mL、酢酸 Na バッファー 40 mL の比率で混合してください (冷蔵で 1 週間保存可能、沈殿が生じると使用不可)。

【III】キットの使用法 (膜電気泳動槽セット: SMME-02 を使用します)

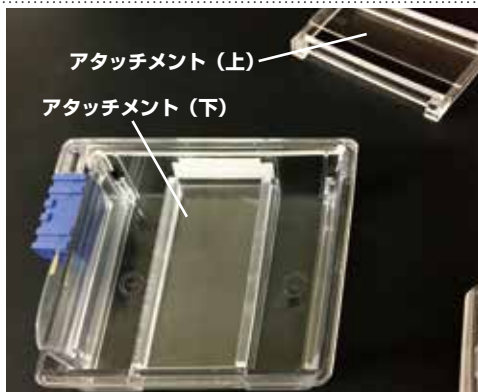
1 親水性ポリマーコーティング PVDF 膜を 100%メタノールに両面 1 ~ 2 秒程度浸し、泳動用バッファーに浸して 10 分以上振盪してください (膜の平衡化)。※親水性ポリマーコーティング PVDF 膜は泳動したいサンプル数に合わせて切ってください。

2 泳動槽の両側に、泳動用バッファーが中央部分に溢れない程度に注ぎます (図 1)。



図 1

3 アタッチメント (下) をセットします (図 2)。



注意: アタッチメント (下) の上下方向

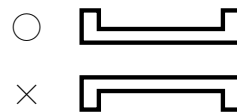


図 2

4 ろ紙を 2 枚取り出し、Z 型に折り目を付け (図 3)、泳動槽に注いだ泳動用バッファーに浸し、アタッチメント (下) にかけます (図 4)。ろ紙は 1 の膜の大きさに合わせて切ってください。また、足りない場合は市販のろ紙 (アドバンテックなど) で代用可能です。



図 3

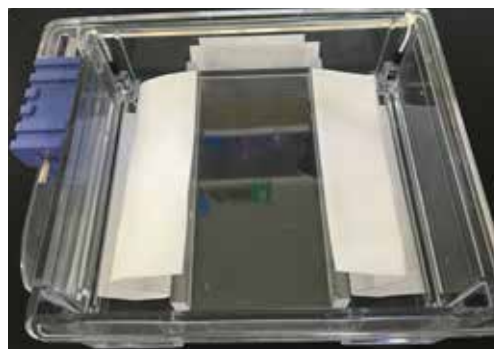


図 4

- 5 1 で平衡化した親水性ポリマーコーティング膜を、余分な水分を軽く除いた上で、4 のろ紙側にブリッジ掛けになるようにセットします (図5)。

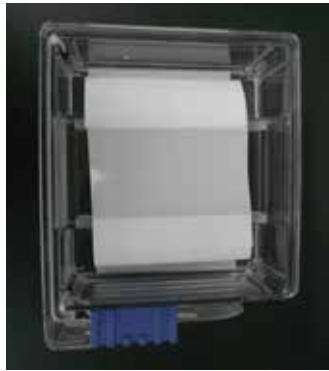


図5

- 6 アタッチメント (上) をセットします (図6)。

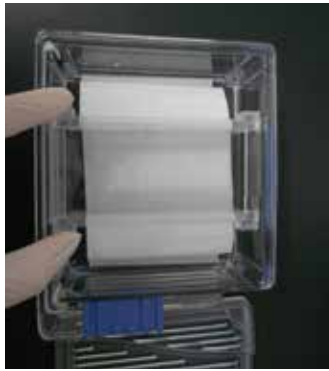


図6

- 7 予備通電を親水性ポリマーコーティング PVDF 膜の幅 1 cm あたり 1 mA で 10~20 分程度 (電圧が安定するまで) 行います。親水性ポリマーコーティング PVDF 膜を切らずに使用する場合、8 mA 定電流です。
- 8 通電を止め、電気泳動マーカーおよび泳動したい検体をアプライします。アプライは通常 1 μ L/ レーンです (図7)。

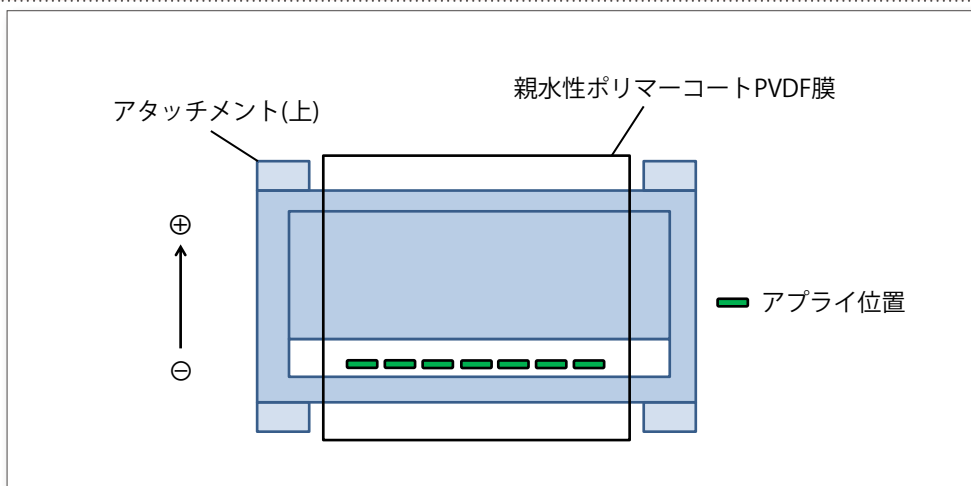


図7. アタッチメント (上) の設置方向とアプライ位置の例

本製品は膜上にマーカーおよび検体をアプライするため、アプライ幅間隔、レーン数の設定などはごさいません。使用目的に合わせて最適な条件を設定してください。

- 9 アプライした検体が親水性ポリマーコーティング PVDF 膜に浸透したのを確認してからフタをします。予備通電と同じ条件で 30 分程度通電 (電気泳動) します。検体をアプライしてから通電までの時間が長いと蒸散流により泳動スタート位置がずれることがありますのでご注意ください。

- 10 マーカーの先頭（黄色）が半分を過ぎたくらいで通電を終了し（図 8）、泳動槽から親水性ポリマーコーティング PVDF 膜を外します。目安は 30 分です。泳動時間が長すぎると電気泳動の進みと反対側からの蒸散流がぶつかり、泳動像が乱れる原因になります。

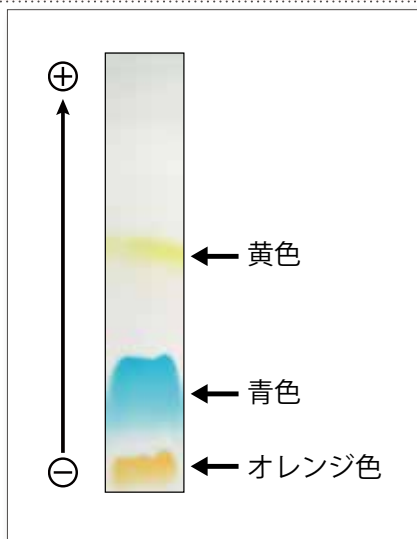


図 8. マーカー泳動例

- 11 別の容器に【II】で調製した固定液を用意して、親水性ポリマーコーティング PVDF 膜を浸して 5～10 分振盪します。この時マーカー色素は抜けてしまいます。
- 12 親水性ポリマーコーティング PVDF 膜を【II】で調製したアルシアンブルー染色液が入った別の容器に移し、これに浸して 30 分振盪します。
- 13 アルシアンブルー染色液を捨て、100%メタノールに浸して振盪し、脱色します（5分×2回程度）。
- 14 染色した親水性ポリマーコーティング PVDF 膜は、観察用については乾燥して保管可能です（図 9）。



図 9. ① デルマトン硫酸 (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、② ムチン ブタ胃由来 和光純薬工業 (株) Cat#597-07661 (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、③ ムチン ウシ顎下腺由来 MP Biomedicals, Inc. Cat#155742 (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、④ ヒアルロン酸 (0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)。アプライ量各 1 μL 。

- 15 泳動後の親水性ポリマーコーティング PVDF 膜からバンドを切り取り、糖鎖解析を行うことも可能です。詳細はコスモ・バイオ web ページの記事 ID 検索：17435 をご覧ください。



【IV】トラブルシューティング

1. 泳動用バッファーが足りなくなりそうな場合は、泳動後に回収して再利用が可能です。ただし蒸発による濃度変化や pH (4.0) に変化があると電気泳動結果に影響が出ますので長期保存は避けてください。
2. サマリウム型泳動槽に付属するパワーサプライでは、安全装置が働いてエラーが出る場合があります。本来の使用用途と電流・電圧値が異なることが原因ですので、1 ~ 10 mA 定電流、100 ~ 135 V で使用可能なものを選択してください。当社で動作確認済みのパワーサプライの品番は以下の通りです。
GEヘルスケア：EPS3501 および EPS 3501XL
3. 電気泳動の電流値を上げて発熱したり、電気泳動時間が長すぎると蒸散流の影響でスマイリングを起こすなど、泳動方向が外側に向かうことがあります。膜の幅 1 cm につき 1 mA 定電流を守り、30 分を目安にマーカが膜の中間地点を過ぎたら止めるのがコツです。

【V】参考文献

1. Supported molecular matrix electrophoresis: a new tool for characterization of glycoproteins.
Matsuno YK, Saito T, Gotoh M, Narimatsu H, Kameyama A.
Anal Chem. 2009 May 15;81(10):3816-23. doi: 10.1021/ac900157c. [PMID: 19368346]
2. Improved method for immunostaining of mucin separated by supported molecular matrix electrophoresis by optimizing the matrix composition and fixation procedure.
Matsuno YK, Dong W, Yokoyama S, Yonezawa S, Saito T, Gotoh M, Narimatsu H, Kameyama A.
Electrophoresis. 2011 Jul;32(14):1829-36. doi: 10.1002/elps.201000608. [PMID: 21710557]
3. A procedure for Alcian blue staining of mucins on polyvinylidene difluoride membranes.
Dong W, Matsuno YK, Kameyama A.
Anal Chem. 2012 Oct 16;84(20):8461-6. doi: 10.1021/ac301678z. [PMID: 22950532]
4. Identification of mucins by using a method involving a combination of on-membrane chemical deglycosylation and immunostaining.
Matsuno YK, Dong W, Yokoyama S, Yonezawa S, Narimatsu H, Kameyama A.
J Immunol Methods. 2013 Aug 30;394(1-2):125-30. doi:10.1016/j.jim.2013.06.002. [PMID: 23770070]

【VI】 関連商品

品番	品名	包装	希望販売価格 (税抜)
SMME-02	膜電気泳動槽セット	1 unit	25,000 円

本商品をご利用になられた文献、発表データを募っております。

本商品をご利用いただき投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付方法

郵 送

〒047-0261 北海道小樽市銭函 3 丁目 513 番 2
コスモ・バイオ株式会社 札幌事業所 宛

E-mail

primarycell@cosmobio.co.jp ※ PDF ファイルにてお送りください。

