

核酸電気泳動ゲルの蛍光染色

Keyword : 蛍光、イメージング、Typhoon、エチジウムブロマイド、Vistra Green、リニアダイナミックレンジ

はじめに

核酸電気泳動ゲルの蛍光検出は多くの研究施設で制限酵素処理サンプルの分離、PCR産物の解析やその他のアプリケーションで使用されています。エチジウムブロマイド染色は核酸電気泳動の検出において最もよく使用されている手法です。Vistra GreenやSYBR Greenは、より高感度の検出を行うことができます。これらの色素はDNAとより高い親和性を示し、結合により蛍光強度が増加します。検出はUVトランスイルミネーターで行うことが可能ですが、蛍光スキャナーを使用することでより高感度な検出をすることができます。

TyphoonパリアブレイメージアナライザーはエチジウムブロマイドあるいはVistra Green染色を行った核酸電気泳動ゲルに適した励起光源・検出システムを搭載しています。Typhoon 8600と9200のシリーズは蛍光イメージングに適した2種類の励起光源：Green(532 nm)とRed(633 nm)レーザーを装備しています。Typhoon 9400シリーズはそれらに加えてBlueレーザーの2つの励起光源(457 nmと488 nm)を装備しています。

実験プロトコール

1. 蛍光検出用ゲル作製の注意点

アガロースゲルのバックグラウンドはゲルの厚さと濃度に比例して増加します。そのため高感度検出を行う場合は5 mm以下のゲルを使用します。また、ゲル作製時に解けずに残ったアガロースの粒子は点状のバックグラウンドとして検出されるためアガロースは完全に溶解します。アクリルアミドゲルのバックグラウンドは厚さ、濃度にほとんど影響されません。ガラスプレートに支持したゲルをTyphoonでスキャンする場合には、厚さが3 mmの無蛍光ガラスプレートを使用します。

2. 蛍光検出におけるサンプル作製の注意点

分子量が小さい核酸サンプルを電気泳動し検出する場合、ローディングダイにプロモフェノールブルーやキシレンシアノールが含まれていると色素が蛍光を発生してバンドと重なってしまいます。バンドが検出できなくなる可能性があるため、使用は避けてください。サンプル添加時に着色が必要な場合、ブルーデキストランなど、通電しても移動せずゲルの中に入らない色素を使用してください。電気泳動中の移動度のモニタリングが必要な場合には、色素の濃度を最小限に抑えるか、サンプル以外のレーンにアプライします。

3. ゲル染色と脱色

Vistra Greenは1×TE (pH 7.5)で10,000倍に希釈して使用します。エチジウムブロマイドは1×TE (pH 7.5)で0.25 µg/mlの濃度に希釈して使用します。

染色液の入ったポリプロピレン容器中にゲルを30分間浸けま。濃度の高いアガロースゲルの場合は染色時間を延ばすか、ゲルを染色液中で振とうさせる必要があります。室内光によるフォトブリーチングを防ぐため、容器はアルミホイルなどで遮光します。

ゲルの片面にガラスプレートを付けたままVistra GreenおよびSYBR シリーズの蛍光色素で染色する場合は溶液をゲル表面にかけた後、染色液が均一になるようにラップでゲル表面を覆います。

染色後、エチジウムブロマイドの場合は脱イオン水で30分脱色します。Vistra Greenの場合は脱イオン水で5分程度振とうしてゲルを洗浄します。

注意: エチジウムブロマイドやVistra Greenの毒性は完全には確認されていませんが、DNAにインターカレートし、潜在的に突然変異源になりうるので吸入、摂取あるいは皮膚吸収が人体に有害な影響をおよぼす恐れがあります。使用する際は白衣、グローブや保護メガネなどを必ず着用するようにしてください。皮膚に付いた場合には、少なくとも15分間流水で洗い流し、吸引した場合は新鮮な空気を吸引し、医師の助言を受けてください。

表1. エチジウムブロマイドおよびVistra Green染色の推奨Typhoon設定

蛍光色素 (最大励起波長/最大蛍光波長)	Laser (励起波長)	Emission filter (検出フィルター)
エチジウムブロマイド (526 nm/605 nm)	532 nm	610BP30
Vistra Green (495 nm/520 nm)	532 nm (Typhoon 8600,9200シリーズ) 488 nm (Typhoon 9400シリーズ)	526SP (Typhoon 8600,9200シリーズ) 520BP40 (Typhoon 9400シリーズ)

4. 画像の取込み

Typhoonでウェットゲル画像の取込みを行う場合:

ゲルを直接スキャンエリアにのせます。ガラスとゲルの間に空気が入らないように注意してください。焦点深度の設定は“platen”を選択します。厚みのあるアガロースゲルを撮る場合には、焦点深度を“+3 mm”にします。画像の取込みは表1の推奨条件で行ってください。

ゲルの片面にガラスプレートを付けたまま検出を行う場合:

Typhoonで画像を取り込む前に、ガラスのゲルが付いていない面のスペーサー部分にKaptonテープを貼り付けます。次にスキャンエリアに少量の脱イオン水を載せ、Kaptonテープを貼り付けたガラスプレートを上から載せます。このとき本体とガラスプレートの中に空気が入らないようにします。焦点深度は“+3 mm”に合わせます。画像の取込みは表1の推奨条件で行ってください。PMTボルテージはサンプル量に応じて調節します。

スキャンした後に、脱イオン水でぬらした柔らかい埃の出にくい紙(ケイドライなど)でガラスプレートあるいはガラスステー

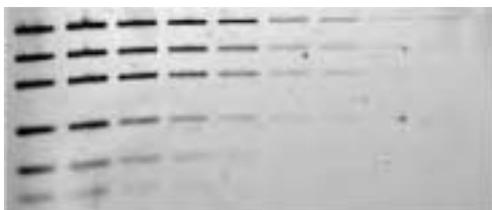
ジをきれいに拭きます。必要に応じて、サンプルリッドも拭きます。次に75 %エタノールでガラスステージを拭き取ります。最後にエタノールによって溶出した蛍光性の残留物を脱イオン水にて取り除きます。通常の洗浄でガラスプレートあるいはガラスステージの汚れが落ちにくい場合、5~10 %過酸化水素溶液で拭き取り、再び脱イオン水で残った過酸化水素を除去します。

結果

核酸の電気泳動ゲルをTyphoonで検出した場合の結果を図1に示します。Vistra Greenはエチジウムブロマイドの10倍以上の感度を持つことが分かりました。

また、核酸ゲル染色の検出限界は励起光の波長が異なっても変わりませんでした(図2)。原理的には最大励起波長に近い励起光を照射したほうが感度は高くなると考えられます。図2の場合、Vistra Greenの最大励起波長は490 nmなので532 nmより488 nmの光で励起したほうが感度は高くなると考えられます。しかし、実際にはどちらの画像結果もほぼ同等の感度にな

A. エチジウムブロマイド染色したアガロースゲル



B. Vistra green染色したアガロースゲル



C. エチジウムブロマイド染色したアクリルアミドゲル



D. Vistra Green染色したアクリルアミドゲル

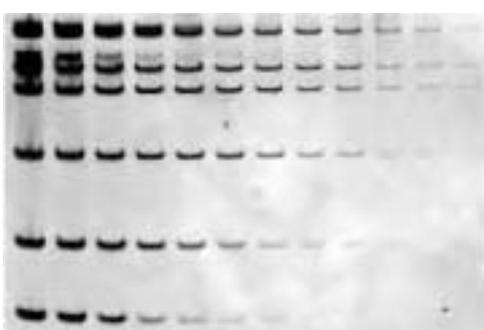


図1. 2倍ずつ段階希釈したDNA mass ladderの電気泳動図

[上段] 1 %アガロースゲルを用いて泳動し、エチジウムブロマイド (A) およびVistra Green (B) で染色しました。左端のレーンは2,000 bp : 20 ng, 1,200 bp : 12 ng, 800 bp : 8 ng, 400 bp : 4 ng, 200 bp : 2 ng, 100 bp : 1 ngを示します。

[下段] 10%アクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、エチジウムブロマイド (C) およびVistra Green (D) で染色しました。左端のレーンは2,000 bp : 10 ng, 1,200 bp : 6 ng, 800 bp : 4 ng, 400 bp : 2 ng, 200 bp : 1 ng, 100 bp : 0.5 ngを示します。

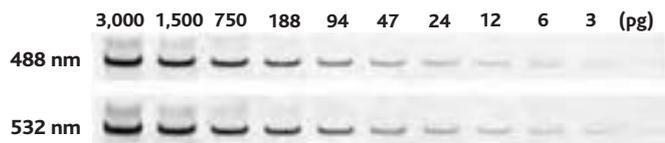


図2. 励起光の波長による検出限界の違い

10%アクリルアミドゲルで1.2 kb DNA バンドを電気泳動し、Vistra Greenで染色しました。検出にはTyphoonの488 nm(上の画像)と532 nm(下の画像)のレーザーでそれぞれ励起し520BP40と526SPの蛍光フィルターで検出を行いました。

表2. 1.2 kb のDNAバンドを1%アガロースゲルおよび10%アクリルアミドゲルで電気泳動しTyphoonで検出した場合の検出限界

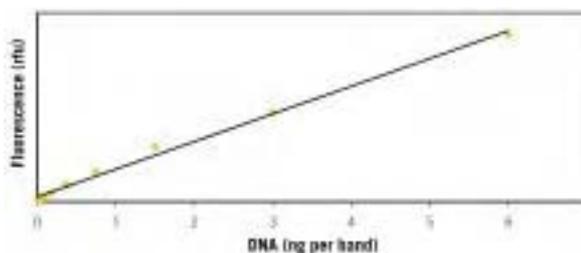
蛍光色素	LOD (pg/band)	リニアダイナミックレンジ (fold)
エチジウムブロマイド	50/6*	~ 500/1,000*
Vistra Green	10/3*	~ 500/1,000*

* 数値は1% アガロースゲル / 10% アクリルアミドゲルの順で記載

りました。この要因はゲルに非特異的に吸着した色素やその他のバックグラウンドによると考えられます。

表2にエチジウムブロマイドとVistra GreenのTyphoonによる検出限界とリニアダイナミックレンジを示しました。S/N(シグナル/ノイズの比)が3以上の数値を検出限界としました。Typhoonは5オーダーのリニアダイナミックレンジを持っていますが、DNAゲル染色検出ではバックグラウンドや色素自体の性質から2~3オーダー程度のリニアダイナミックレンジを示します(図3)。将来的に3オーダー以上の核酸染色試薬が開発されれば、より高い定量性を持った画像結果を得られる可能性があります。

A. Vistra Greenで染色したアガロースゲルでの直線性



B. Vistra Greenで染色したポリアクリルアミドゲルでの直線性

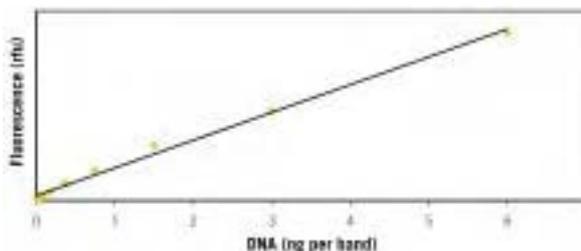


図3. ゲルの違いによる直線性の違い

1.2 kbのDNAバンドではアガロースゲルでは12 pg から 6 ngまで (A)、ポリアクリルアミドゲルでは3 pgから3 ngまで (B) でR2値が0.99以上の優れた直線性が得られました。

参考文献

1. Fluorescence Imaging: principles and methods, GE Healthcare, code number 63-0035-28 (2000).
2. Singer, V. L. and Haugland, R. P., in *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity 2nd Ed.* (Mason, W.T., ed.), Academic Press, San Diego, pp. 51-62 (1999).
3. Tuma, R. S. et al., *Anal. Biochem.* **268**, 278-288 (1999).

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073

東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL : 03-5331-9336 FAX : 03-5331-9370

e-mail : Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。