

蛍光検出基礎知識 検出の達人への道①

アガロースゲル電気泳動

Now part of
GE Healthcare

GE imagination at work

Key Word : アガロース

milestoneでは 電気泳動の蛍光検出のシリーズを6回に分けてお届けします。第1回はアガロース電気泳動についてです。

原理

アガロースゲル電気泳動は、核酸を分離するために最もよく利用される手法です。アガロースゲルはポリアクリルアミドゲルと比較してゲルの網目構造が大きいので、数十～数百KbpのDNAフラグメントを長さや分子構造の違いで分離することができます(図1)。DNAフラグメント全体の荷電状態は主にリン酸基の数に依存するため、移動度は原則的にDNAフラグメントの長さに比例します。泳動後のゲルを、エチジウムブロマイド(EtBr)やVistra GreenのようなDNA鎖にインターカレートする蛍光試薬で染色してDNAを検出します。インターカレート試薬を含むゲルで泳動を行うと、DNAの構造によりインターカレートする試薬量が異なるため直鎖状DNAと環状DNAを分離することもできます。電場方向を断続的に変化させて泳動すると酵母染色体などの巨大DNAも分離可能です(パルスフィールド電気泳動)。

アガロースゲル電気泳動は、PCR産物の確認、DNAクローニング実験、DNAフラグメント解析のほか、サザンハイブ

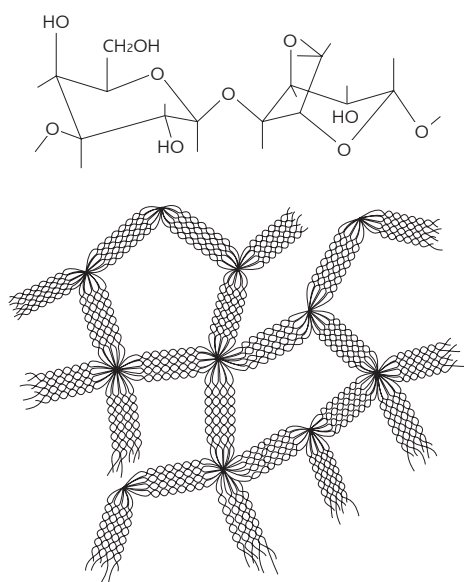


図1. アガロースゲルの構造

D-ガラクトースと3,6-アンヒドロ-L-ガラクトース1:1のモル比からなるアガロースは、低温度の熱をかけて溶解後、冷却するとある一定の網目構造をもつゲルになります。

リダイゼーションやノーザンハイブリダイゼーションを行う時に用いられる手法でもあります。

試薬・装置の選択

アガロース

アガロースには電気浸透度、ゲル強度、融点などの違いにより、多くの種類があります。使用目的や分離するDNAフラグメントのサイズに合わせて選択します。DNAフラグメントを切り出して精製する場合には、低融点アガロースを選択します。

DNA マーカー

λ DNA やプラスミドDNAを制限酵素で処理したマーカーや、100 Base Pair Ladderマーカーのように100 bp単位でバンドを検出できるマーカーがあります。分離するDNAサイズ、使用するゲル濃度に適したマーカーを選択します。

泳動装置

バッファーを満たした水平型電気泳動装置にアガロースゲルを沈めて泳動する方法(サブマリン電気泳動)が一般的です。泳動結果を迅速に得たい場合は、ゲルサイズの小さい泳動装置を選択します。高い分離能で結果を得たい場合は、泳動距離が長い大きなゲルを泳動できる装置を選択します。ゲルの冷却ができる装置を用いると、高い電圧をかけられるため泳動時間短縮が可能でシャープな結果が得られます。

染色体やゲノム断片の解析など巨大DNAを分離する場合は、電場の方向を断続的に変更できるパルスフィールド電気泳動装置を用います。

DNAフラグメントの検出法

蛍光染色試薬Vistra GreenやEtBrは二本鎖DNAの間に入り込み(インターカレーション)、UV照射下でゲル中の核酸を可視化することができます。泳動前にEtBrを混ぜてアガロースゲルを作製し、検出する方法と、泳動後にEtBr溶液でゲルを染色して検出する方法がありますが、インターカレーターを混ぜたゲルの場合バックグラウンドが高くなり、相対的に感度が下がる可能性があります。また、TyphoonやSTORMのような蛍光検出可能なイメージスキャナーで高感度検出することができます(表1、図3)。

注) EtBrは、高い発ガン性が疑われているため、取り扱いには十分な注意が必要です。

表1. 核酸フラグメントの検出法

| 検出試薬 | 特徴 | 推奨UV |
|--------------|---------------------------|--------------------------------------|
| EtBr | 汎用されている | 302 nm |
| Vistra Green | dsDNAのみならず、ssDNAやRNAの検出可能 | 254 nm 励起波長：490 nm 蛍光波長：520 nm |

実験例

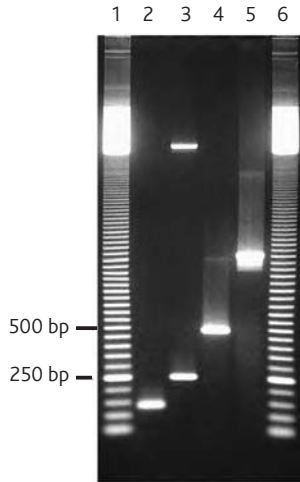


図2. 50 Base-Pair LadderとDNAサンプルの泳動結果

TAE 泳動バッファー、2% アガロースゲルで展開しました。EtBr 染色して、UV で検出しました。

- レーン1：50 Base-Pair Ladder
- レーン2：PCR産物 (137 bp)
- レーン3：プラスミド *Ava* I消化産物 (250 bp)
- レーン4：PCR産物 (504 bp)
- レーン5：PCR産物 (887 bp)
- レーン6：50 Base-Pair Ladder

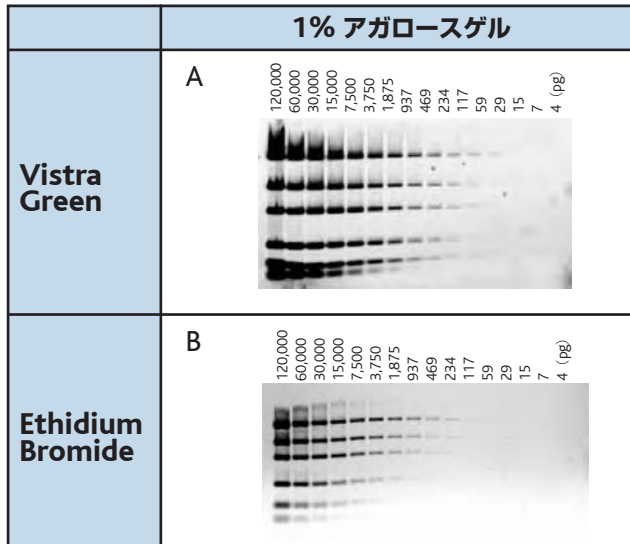


図3. Vistra Green Nucleic Acid Stain と Ethidium Bromide Solution によるゲルの染色例

電気泳動後、Vistra Green で30分間染色した結果 (A) と、Ethidium Bromide 添加アガロースゲルの電気泳動結果 (B) です。それぞれ Typhoon にて検出しました。ゲルの上の数字は各レーンに添加したDNA量を示します。

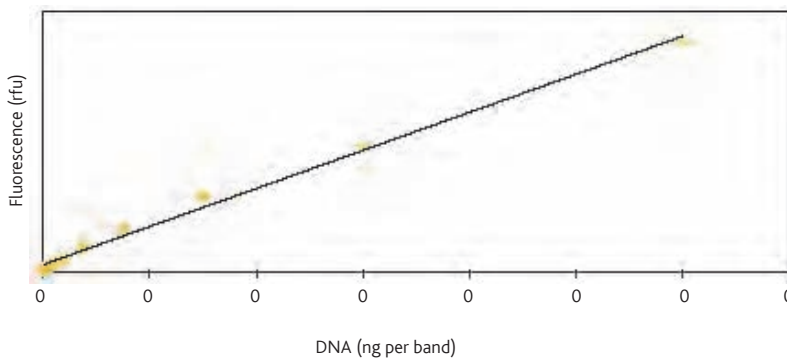


図4. Vistra Green の直線性

12 pg ~ 6 ng の 1.2 kb DNA をアガロース電気泳動し、Vistra Green で染色後、Typhoon を使用して 532 nm の波長にて検出しました。蛍光は、ImageQuant にてボリューム解析し、relative fluorescence unit (rfu) で示します。ボリューム解析は、Rectangle オブジェクト方式、バックグラウンド補正は Histogram Peak 方式にて行いました。(R² > 0.99)

蛍光検出でのポイント

アガロースゲルの作製

アガロースゲルの場合、ゲル自体が蛍光性をもつので、バックグラウンドを抑えるために、ゲルの厚みを5 mm程度に抑えます。電子レンジ加熱にてアガロースを溶解する場合、完全に溶解していないこともありますので、突沸に注意しながらボトルを軽く振るなどして完全に溶解させます。溶解が不完全な場合、ゲルに粒状のノイズが出現することがあります。

泳動に際して

サンプル添加時に用いる色素マーカー（プロモフェノールブルーやキシレンシアノールなど）も蛍光を発するので、電気泳動後の結果に影響を及ぼします。特に定量実験では、目的のバンドと色素マーカーの位置が重なった場合、正確な定量値が得られません。

アガロースゲル電気泳動では、色素マーカーの移動度を指標に泳動時間を決めるケースがありますが、泳動後にサンプルの定量をする場合などは、色素マーカーは左右どちらか端の1レーンのみに流すことをお勧めします。

検出時

電気泳動時の泳動バッファーとして一般的に利用されているTBEに含まれるホウ素も蛍光を発します。この蛍光を低減するにはイメージャーで取り込む前にゲルの状況にもよりますが、泳動後にゲルの表面を蒸留水で軽く洗うことも有効です。この時、ゲルは乾燥させないように注意してください。ゲルが乾燥するとバックグラウンドが全体的に上昇する傾向があります。特に、装置体内部でゲルを測定するタイプの機器では、内部の送風によりゲルが乾燥しやすくなる場合があります。

また、TBEを含んだサンプルを使用した場合、サンプルを載せたステージまたはトレイは乾く前に蒸留水で必ず洗浄してください。TBEバッファーは一旦乾燥しますと、落ちにくくなりますのでご注意ください。

ステージ下から励起測定するタイプのスキャナーなどでは、ゲルの乾燥を防ぐために無蛍光ガラスをゲル上にかぶせるという方法もあります。この方法は検出中にゲルのズレを抑えるだけでなく、乾燥を防ぐうえでも効果があります。

実験例

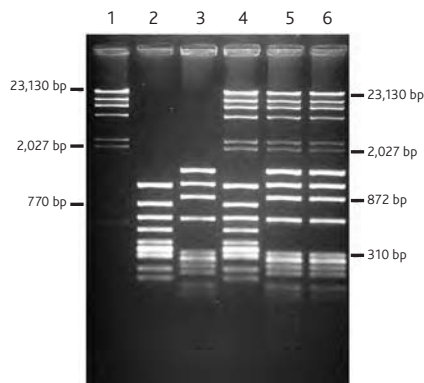


図5. 制限酵素処理したDNAをそれぞれ、TBE泳動バッファー、1%アガロースゲルで展開後、EtBr染色して、UVで検出しました。

- レーン1：0.5 g λ DNA-Hind III 消化物
- レーン2：0.5 g φ X-174 RF DNA-Hinc II 消化物
- レーン3：0.5 g φ X-174 RF DNA-Hae III 消化物
- レーン4：1 g λ DNA-Hind III / φ X-174 RF DNA-Hinc II 消化物
- レーン5：1 g λ DNA-Hind III / φ X-174 RF DNA-Hae III 消化物
- レーン6：1 g DRlgest III (λ DNA-Hind III / φ X-174 RF DNA-Hae III 消化物)

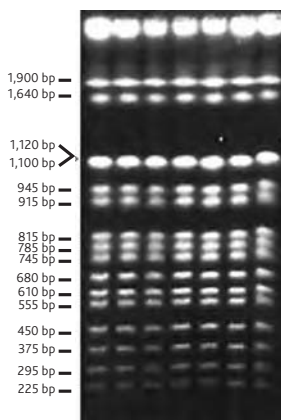


図6. Yeast DNA-PFGE Markersをパルスフィールド電気泳動装置を用いて1%アガロースゲル、0.5×TBE泳動バッファーで展開し、EtBr染色してUVで検出しました。

泳動時間：27時間、電圧：200 V、パルスタイム(ステッピングモード)：70秒 15時間、120秒 12時間

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。