

蛍光検出基礎知識 検出の達人への道② DNAのポリアクリルアミドゲル電気泳動

Key Word : ポリアクリルアミド、核酸電気泳動、SSCP、ゲルシフトアッセイ

現在、分子生物学の分野で汎用されている電気泳動法の中で、最も広く用いられているものの一つがポリアクリルアミドゲルを用いた方法です。

ポリアクリルアミドはアガロースに比べて架橋構造が細かいことから、より小さい分子の分離が可能で、核酸からタンパク質まで幅広い応用ができます。

原理

ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、DNAフラグメントの解析などに用いられ、ポリアクリルアミドゲルの微細な網目構造を利用して、アガロースゲル電気泳動の場合に比較して短鎖(~1 Kbp)のフラグメントを長さや構造に基づいて高分離する手法です。DNAの立体構造(コンフォメーション)の影響を強く受けるため、DNA鎖長の推定には、二本鎖DNAを泳動する必要があります。一本鎖DNAは配列のわずかな違いによってさまざまな立体構造を取るために移動度とそのDNA鎖長との間に相関は見られず、しばしば複数のバンドとして検出されます。これを利用したDNAフラグメント解析手法(SSCP: Single-Strand Conformation Polymorphism)も開発され遺伝子変異解析に利用されています(図1)。

特殊な配列(繰返し配列や塩基の偏りなど)を含む二本鎖DNAフラグメントは二本鎖DNA構造を歪め、泳動パターンに影響を与えることが知られており、この特性を利用してポリアクリルアミドゲル電気泳動法でDNAの構造・機能解析を行うという手法もあります。また、ureaなどを含む変性ゲルを用いれば、一本鎖DNAも構造の影響を受けることなく鎖長に応じて高分離能することもできます。

関連情報—良好な結果を得るためのKey Point

泳動条件

DNAフラグメントの移動度は、泳動中のゲル温度の影響を強く受けます。泳動によりゲルが不均一に加熱すると、部分的に泳動が乱れてスマイリングが起こることがあります。ゲル温度を制御できる泳動装置を使用するか、泳動電圧を下げて発熱を抑えた泳動条件を設定してください。特に、一本鎖DNAの泳動では、温度によってDNAフラ

グメントのコンフォメーションが変わるため、高度な温度制御機能を持つ泳動装置を使用しなければ再現性良い結果を得ることはできません(次ページ図2)。

ゲル濃度

ゲルの濃度によって分離できるDNA範囲が異なります。目的のDNAフラグメントの解析を容易にするためには、泳動バッファー中の色素(プロモフェノールブルーやキシレンシアノールなど)がゲル先端まで泳動されたときに、目的フラグメントがゲルの中央付近に位置するようなゲル濃度を選択してください(次ページ表1)。

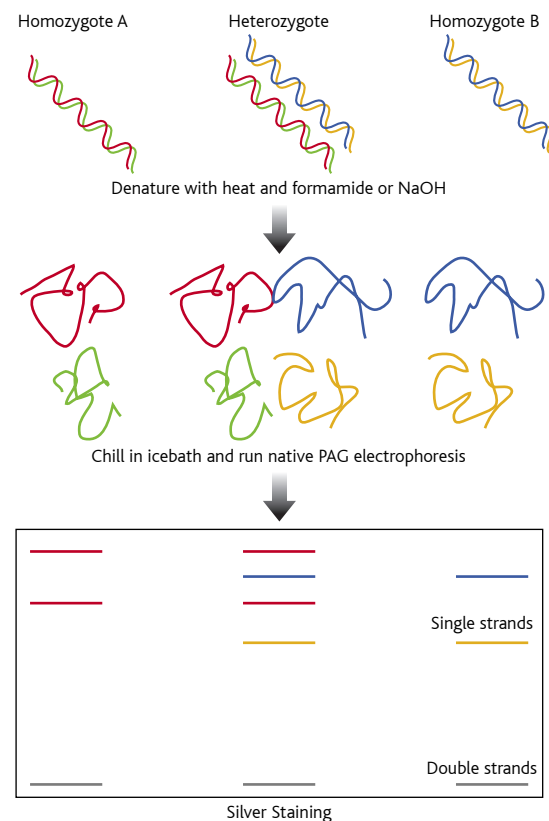


図1. SSCPの原理

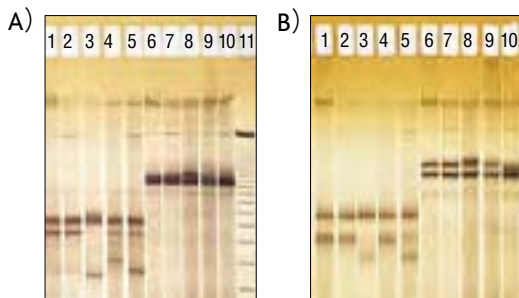


図2. 泳動条件の違いによる分離パターンの変化

- A) 12°C
 レーン1～5: p53 エクソン9～10
 レーン6～10: エクソン7～9
 レーン11: マーカー
- B) 18°C
 レーン1～5: p53 エクソン9～10
 レーン6～10: エクソン7～9
 レーン6～10の分離は18°Cで泳動した方が良好ですが、レーン1～5ではバンドのフォーカスが悪くなっています。

グラジエントゲルは、分離範囲が広く、サンプルの分子量分布を調べるのに適しています。また、一塩基置換変異解析のような高い分離能を必要とする場合は、目的DNAフラグメントの鎖長に近い分画範囲を持つゲルを選択します。

DNA マーカーの選択

市販のDNA マーカーには、プラスミドや二本鎖ファージDNAを制限酵素で消化して作製したマーカーと既知配列を人工的に繰り返して作製したマーカーがあります。ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、DNAの移動度はDNA鎖長だけでなく構造にも依存するため、必要に応じて使い分けます。泳動温度によっても移動度は異なるので、サンプル間で鎖長を比較する場合は、同じ条件で泳動することが大切です。

DNAフラグメントの検出法

泳動後のゲルからDNAフラグメントを検出するには、アガロースゲル電気泳動の場合と同様に、EtBrを加え、UVトランスイルミネーターで観察する方法が一般的です。蛍光スキャナーを使用する場合は、EtBrの代わりにDNA蛍光染色試薬を用いると、より高感度に検出できます。インターカレーターによる染色は二本鎖DNAに特異的なため、一本鎖DNAを検出する場合には銀染色法を用います。DNAは銀染色法で不可逆的に染色されるので、DNAフラグメントを可視化してゲルを保存する場合などにも効果的です。

表1. ポリアクリルアミド濃度とDNAの分画範囲

ポリアクリルアミド濃度 (% [W/V]) ^{*1}	DNA分画範囲 (bp)	キシレンシアンール ^{*2}	プロモフェノールブルー ^{*2}
3.5	1000～2000	460	100
5.0	80～500	260	65
8.0	60～400	160	45
12.0	40～200	70	20
15.0	25～150	60	15
20.0	6～100	45	12

* 1 N,N'-methylenebisacrylamide はアクリルアミド濃度の 1/30 の割合で含まれます。
 * 2 色素と同じ移動度を示す二本鎖 DNA の長さ (bp)。

蛍光検出を行う場合の注意点

アクリルアミドゲルはアガロースゲルと異なり、ゲル自体の蛍光によりバックグラウンドが上昇することはほとんどありません。ただし、ゲル自体が薄く取り扱いがしにくいことから、ガラスまたはプラスチックで支持されている場合がほとんどです。この場合、ガラス板やプラスチック板の蛍光によるバックグラウンドの上昇が生じます。

蛍光検出ではプラスチック板により支持されているプレキャストゲルの使用も可能ですが、プラスチック板はガラス板に比べて蛍光が一般的に高いようです。したがって、感度を要求する実験系の場合は、電気泳動ゲルの支持体としてガラス板を用いることをおすすめします。

弊社では低蛍光ガラス板を使用することをおすすめしています。一般的な電気泳動ゲル支持用の青板ガラスの場合は、ガラス自体が蛍光を有するうえ、ガラスの蛍光量が均一でない場合が多く認められます。また、ガラス自体の汚れにより、画像がきれいに取れない場合もあります。

共焦点方式の蛍光スキャナーの場合は、焦点面以外のシグナルの取込み率は低くなるので、比較的蛍光のバックグラウンドの上昇を抑えることができます。

また、ガラス板に挟んだまま、ゲルのスキャンをすることも可能です。ただし、タンパク質の蛍光検出の場合は、ガラス板の汚れにより感度の低下が起きることがあります。

※使用するバッファーやマーカーに関しては9月発信分 milestone 『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』と同様になりますのでご参照ください。

実験例

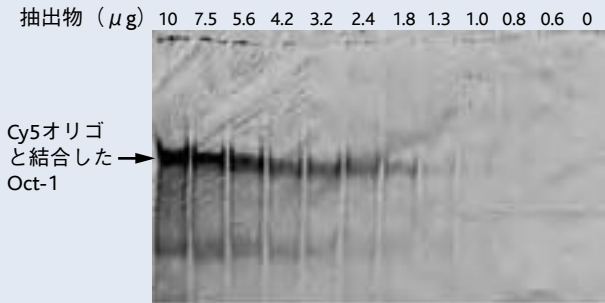


図3. Cy5 標識オリゴを用いた Oct 転写因子の検出

A20 細胞核抽出液に Cy5 標識 Oct オリゴを添加して EMSA (Electro Mobility Shift Assay; ゲルシフトアッセイ) を行いました。電気泳動後にウェットゲルを赤色蛍光モードでスキャンして Cy5 を検出しました。実験条件の詳細は、2003 年 11 月配信分「Cy5 を用いたゲルシフトアッセイ」をご参照ください。



図4. ポリアクリルアミドゲルを用いた核酸電気泳動の例：罹患(N)と罹患(D)腎臓における遺伝子発現の二色FDD解析

フルオレセイン(緑)またはローダミン(赤)標識したアンカープライマー(H-T11)と任意のプライマー(H-AP1)を用い、非罹患(N)と罹患(D)腎臓における遺伝子発現を二色蛍光ディファレンシャルディスプレイ(FDD)法にて解析しました。電気泳動は、変性条件下の6%ポリアクリルアミドゲルにて行いました。発現の差異を際立たせるため、非罹患と罹患サンプル由来のPCR産物を等量ずつ混合し、同じゲルに添加しました(N/D)。発現に差異の見られない遺伝子は黄色で表示されます。画像解析には FluorSep ソフトウェアを用いました。なお、四角で囲ったバンドについては切り出しを行い、シーケンス解析を行いました(データ未掲載)。

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 サンケンビルディング

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。