

電気泳動で核酸を分離したい

使用製品

- ・ Agarose 900 [A426]
- ・ Agarose 1500 [A427]

- ・ -Cellstain®- EB [E262]
- ・ 10x MESA [MB04]
- ・ 10x TBE [MB02]

I はじめに

核酸を対象とする遺伝子工学は数十年前までは極めて特別なものであったが、近年の電気泳動やプロッティング技術の発達により、核酸を用いた実験も比較的容易に出来るようになってきた。ところが、自然界には核酸を分解する酵素が多く含まれるため、生化学実験で一般に使用している緩衝液は、目的の核酸を分解させてしまう危険性がある。小社の電気泳動用緩衝液 (10x TBE, 10x MESA) は、核酸分解酵素 (DNase, RNase) が全く検出されないため、核酸の分解なく電気泳動を行なうことができる。TAE は主にアガロースゲル電気泳動に、TBE, TPE はアクリルアミドゲル電気泳動に用いられることが多い緩衝液である。電気泳動は核酸のサイズによって使い分けられることが多く、一般に 1 kb 以上はアガロースゲル電気泳動、1 kb 以下はアクリルアミドゲル電気泳動が使用される。

小社では電気泳動の支持体として汎用されているアガロースについても、実験目的に応じた、2 種の分子生物学用アガロース (Agarose 900, Agarose 1500) を用意している。

II DNA の電気泳動 (1 kbp 以上)

1. 製品以外に必要なもの
10x TAE、プロモフェノールブルー、キシレンシアノール、グリセロール
2. 方法
 - (1) EB 溶液作製
EB を 0.5 mg/ml になるよう純水に溶解させ、冷暗所で保存する。
 - (2) 色素マーカー
0.25% プロモフェノールブルー、0.25% キシレンシアノールを 30% グリセロール溶液に溶解する。
 - (3) ゲルの作製
 - 1) 目的とする DNA に適した量 (表 1 参照) のアガロースを秤量する。
 - 2) 10 ml の 10x TAE を入れ、全量 100 ml になるように純水を入れる。
* 通常は Agarose 900 を使用する。分析する DNA が大きい場合、低濃度のゲルを調製する場合 (0.5% 以下) は、Agarose 1500 を使用するのが望ましい。
* しばらく放置して、アガロースを膨潤させると、あとで溶け残りが出にくくなる。
 - 3) 電子レンジなどで加熱し、アガロースを溶解させる。
* 突沸する恐れがあるので注意する。また溶け残りが無いことを確認する。
 - 4) 液温が 60℃ 程度に下がったら、0.5 µg/ml になるように EB 溶液を添加する。

表 1 DNA サイズと使用するアガロース濃度

Agarose (%)	DNA (kbp)
0.3	60 ~ 5
0.6	20 ~ 1
0.7	10 ~ 0.8
0.9	7 ~ 0.5
1.2	6 ~ 0.4
1.5	4 ~ 0.2
2.0	3 ~ 0.1

- 5) 電気泳動ゲルの型からゲルが流れ落ちないように、テープで型の両端を貼る。
* アガロース溶液を入れた時、漏れないようにパスツールピペットでテープと型との境目をアガロース溶液でシールする。
- 6) コームを差し、境目のアガロースが固化したら、残りのアガロース溶液を型に流し込む。
- 7) 固化したことを確認したあと、コームを静かに引き抜き、テープを剥がす。
- (4) 電気泳動
 - 1) 電気泳動の泳動バッファーも 10x TAE を用いる。10x TAE 100 ml を純水で 1 L にする。
 - 2) 作製したゲルを泳動槽に装着し、泳動バッファーを流し込む。
 - 3) サンプルと色素マーカーを 5:1 の割合で混和し、ゲルのスロットに注入する。
 - 4) 定電圧で電気泳動を実行する。
 - 5) 色素の泳動距離を目安にし泳動を終える。
 - 6) DNA のバンドの確認は UV を照射して行う。

III DNA の電気泳動 (1 kbp 以下)

1. 製品以外に必要なもの
アクリルアミド、N,N'-メチレンビスアクリルアミド、過硫酸アンモニウム、プロモフェノールブルー、キシレンシアノール、グリセロール、TEMED (N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン)
2. 方法
 - (1) EB 溶液調製
EB を 0.5 mg/ml になるよう純水に溶解させ、冷暗所で保存する。
 - (2) 色素マーカー
0.25% プロモフェノールブルー、0.25% キシレンシアノールを 30% グリセロール溶液に溶解する。
 - (3) ゲルの作製 (12% アクリルアミドの場合)
* 最終アクリルアミド濃度と分離する DNA サイズの目安を表 2 に示す。
 - 1) 30% アクリルアミド溶液: 29 g のアクリルアミドと 1 g の N,N'-メチレンビスアクリルアミドを純水 100 ml に溶解させる。ストック溶液として冷蔵保存する。
 - 2) 10% 過硫酸アンモニウム溶液: 純水で 10% 溶液を調製する。用時調製する。
 - 3) スラブ電気泳動用のガラス板を良く洗浄しておき、組み立てておく。
 - 4) 30% アクリルアミド溶液 40 ml、10% 過硫酸アンモニウム溶液 0.5 ml、10x TBE 10 ml を添加し、純水で全量 100 ml にする。

表 2 DNA サイズと使用するアクリルアミド濃度

Acrylamide (%)	DNA (bp)
3.5	1,000 ~ 100
5.0	500 ~ 80
8.0	400 ~ 60
12.0	200 ~ 40
20.0	100 ~ 10

- 5) 0.5 µg/ml になるように EB 溶液を添加する。
- 6) TEMED 15 µl を添加し、電気泳動の型に流し込む。
- 7) コームを差し、室温で放置して固化させる。
- 8) 固化したことを確認した後、コームを静かに引き抜く。

(4) 電気泳動

- 1) 電気泳動の泳動バッファーも 10x TBE を用いる。10x TBE 100 ml を純水で 1 L にする。
- 2) 作製したゲルを泳動槽に装着し、泳動バッファーを流し込む。
- 3) サンプルと色素マーカートを 5:1 の割合で混和し、ゲルのスロットに注入する。
- 4) 定電圧で電気泳動を実行する。
- 5) 色素の泳動距離を目安にし泳動を終える。
- 6) DNA のバンドの確認は UV を照射して行う。

IV ホルムアルデヒド含有アガロースゲルを用いた RNA の電気泳動

MESA は RNA の検出やサイズ決定などを行う Northern Blotting に用いる。その他 RNA の分子量決定に用いる電気泳動でも、よく使用されている緩衝液である。RNA は容易に切断分解されるため、その取り扱いには特に注意を要する。希釈する純水はオートクレーブ処理したものを使用する。また 0.1% 二炭酸ジエチルを添加してオートクレーブ処理したものは RNase を不活性化するとされている。以下の実施例の純水は二炭酸ジエチル処理したものを使用する。

1. 試薬

10x MESA (Code: MB02)、*アガロース [Agarose 900(Code: A426) または Agarose 1500 (Code: A427)], ホルムアミド、**ホルムアルデヒド、EB(Code: E262)、プロモフェノールブルー、キシレンシアノール、グリセロール

* 通常は Agarose 900 を使用する。分析する DNA が大きい場合、低濃度のゲルを調製する場合 (0.5% 以下) は、Agarose 1500 を使用するのが望ましい。

**ホルムアルデヒドの蒸気は毒性を有するので、取扱いはフード内で行う。

2. 方法

(1) EB 溶液

EB を 0.5 µg/ml 濃度になるよう純水に溶解させ、冷暗所で保存する。

(2) 色素マーカート

0.2 mg/ml プロモフェノールブルー、0.2 mg/ml キシレンシアノール、62.5 % ホルムアミド、1.14 mol/l ホルムアルデヒド、1.25x MESA になるように溶解させる。

(3) ゲルの作製

1) アガロースに 68 ml の純水を添加し、電子レンジなどで加温溶解する。

* 突沸する恐れがあるので注意する。また溶け残りが無いことを確認する。

2) 液温が 60°C 程度に下がったら、10 ml の 10x MESA, 22 ml のアルデヒド溶液を添加する。

3) 電気泳動ゲルの型からゲルが流れ落ちないように、テープで型の両端を貼る。

* アガロース溶液を入れた時、漏れないようにパスツールピペットでテープと型との境目をアガロース溶液でシールする。

- 4) コームを差し、境目のアガロースが固化したら、残りのアガロース溶液を型に流し込む。
- 5) 固化したことを確認した後、コームを静かに引き抜き、テープを剥がす。

3. 電気泳動

- 1) 電気泳動の泳動バッファーも 10x MESA を用いる。10x MESA 100 ml を純水で 1 L にする。
- 2) 作製したゲルを泳動槽に装着し、泳動バッファーを流し込む。
- 3) サンプルと色素マーカートを 5:1 の割合で混和し、ゲルのスロットに注入する。
- 4) 定電圧で電気泳動を実行する。
- 5) 色素の泳動距離を目安にし泳動を終える。
- 6) ゲルを EB 溶液に漬け (15 分間) 染色させる。
- 7) RNA のバンドの確認は UV を照射して行う。

参考文献

1) J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis "Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2nd. Ed.", 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

細胞
増殖/毒性
酸化
ストレス
分子生物学
細胞内
蛍光プローブ
細胞
染色
ミトコンドリア
関連試薬
細菌研究用
試薬
膜タンパク質
可溶化剤
ラベル
化剤
二価性
試薬
イオン
電極
その他
機能性
有機材料