

# ATTO Technical Manual

## アガロースゲルの 蛍光色素染色と 蛍光検出撮影のコツ

核酸のアガロースゲル電気泳動のコツ

アガロースゲルの蛍光色素染色のコツ

蛍光色素染色ゲルの撮影の原理とコツ

### ATTO Corporation

1-5-32 Yushima Bunkyo-ku Tokyo 〒113-0034

TEL 03-3814-4861 FAX 03-3814-4868

URL <http://www.atto.co.jp>

### ATTO Corporation (Osaka)

2-1-7 Minami-Morimachi Kita-ku Osaka City

〒530-0054

TEL 06-6365-7121 FAX 06-6365-7125

## はじめに

核酸(DNA/RNA)を分析するために、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲル(PAG)などによる電気泳動法が広く使用されています。核酸はゲル中で、分子量毎、バンド状に分離されます。これを可視化、検出することは広義で「染色する」と言われています。

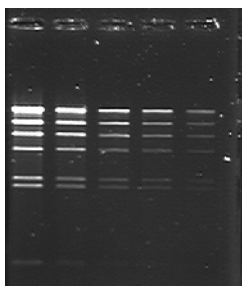
ここでは、色々な「染色する」の中から、感度や定量性などに優れる「蛍光色素染色法」について記述し、アガロースゲル電気泳動法をテキストに実験上のコツなどをまとめました。

## 目指す結果は？

核酸のアガロースゲル電気泳動のパターンの理想のポイントは以下のとおりです。

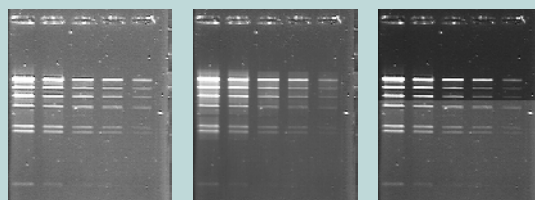
- バンドがシャープである
- バックが低い(高S/N)
- バックが均一である
- 泳動がまっすぐ
- 輝度と濃度に比例関係がある

これらの条件を満たすためには、使用する装置の機能、実験の操作上のコツなどが重要です。実際にきれいなパターンを出すためにはどのようなことをすればいいのか？をまとめたのがこの資料です。



## あ～！失敗してしまった

原因は色々と考えられますが、最終的なデータがこんな風になったらうれしくありません。こうならないためにこの技術資料を参考に実験をしてみてください。



- ▲ 高いバック
- ▲ バンドのボケ
- ▲ 2層バック

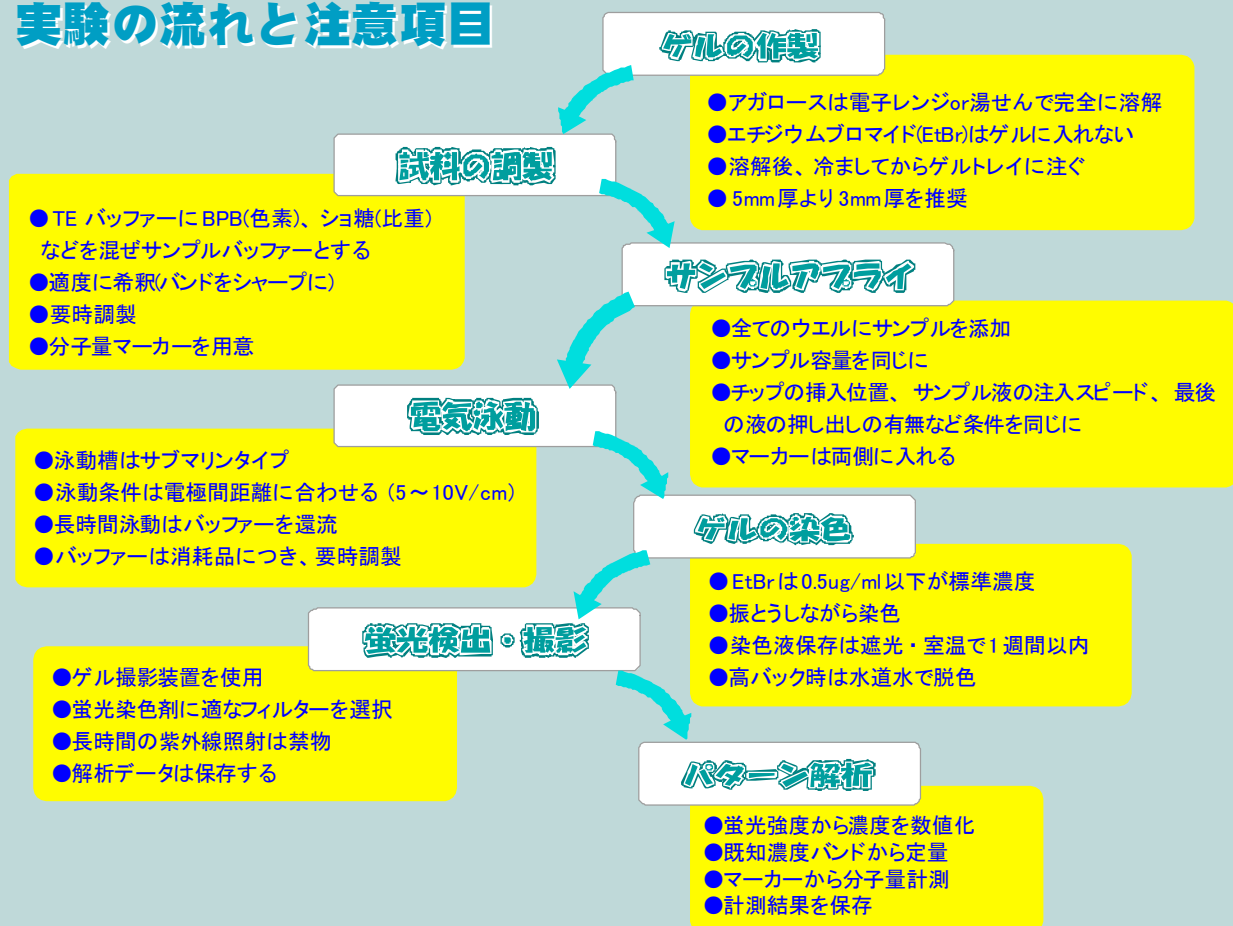
※上の画像は、実際の現象に似せて加工したものです。

## 実験の流れ

核酸の電気泳動で最も一般的なアガロースゲル電気泳動について実験方法を解説します。以下はその実験の流れと各ステップでのポイントを書き出しました。以降のページではそれぞれのステップについて手順や注意すべき点等をまとめます。

「実験の流れと注意項目」の図では各ステップでの主な注意点、コツなどの要件を列挙しています。次ページからはこれらの詳細を説明していきたいと思います。

## 実験の流れと注意項目



## ゲルの作製

①アガロースゲルの濃度を決め、秤量します<sup>※1</sup>。

バッファー量:ゲルの幅(W)×長さ(L)×厚み(H)cm=Aml

アガロース量: A×ゲル濃度%= Bg

ゲル厚は標準的に 5 mm が広く使用されていますが、3 mm にすることでバンドがシャープになります。

②TAE<sup>※2</sup>またはTBE<sup>※3</sup>バッファーをメスフラスコでAml計量し、アガロースの粉末と混ぜます。

③アガロース、バッファーを三角フラスコに入れたら**全体の質量**

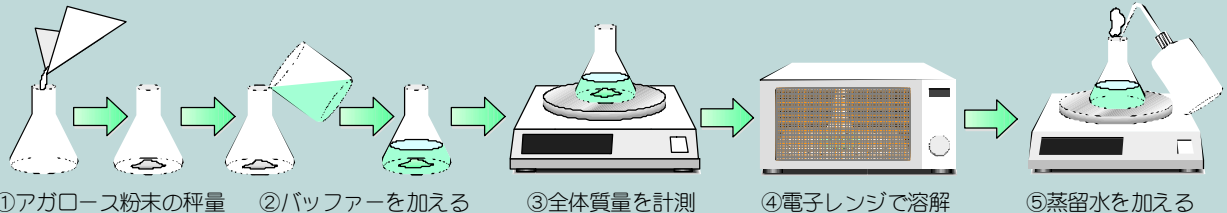
を量り、記録しておきます。

④電子レンジまたは湯せんなどでアガロースを完全に溶解します。電子レンジを使用する場合は突沸<sup>※4</sup>に注意してください。沸騰してきたら停止させ、泡立っていないよう攪拌し、再度あたためます。

⑤アガロースが完全に溶けたら、三角フラスコを秤に載せ、質量を量ります。加熱により蒸発した水分は蒸留水を追加し、記録しておいた質量に合わせます。ゲル溶液は約60℃以下になるまで冷ましておきます<sup>※5</sup>。



注意:ゲルにEtBr (エチプロ)を入れない方が定量性がよくなります。定量しない場合は入れても問題ありません。泳動像p2「失敗してしまった2層バック」



①アガロース粉末の秤量

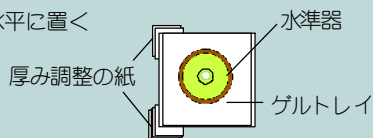
②バッファーを加える

③全体質量を計測

④電子レンジで溶解

⑤蒸留水を加える

⑥ゲルトレイを水平に置く



⑦冷ましたゲルをゲルトレイに注ぐ

⑧ゲルを固化させる

⑥水準器を用いて、ゲルトレイを水平に設置します。微妙な調整は、紙などを重ねて行うと容易に行えます。

⑦コウムをセットしたゲルトレイにゲル溶液を注ぎます<sup>※5</sup>。

⑧しばらく放置しゲルが固まるのを待ちます。

※1: アガロースの種類や濃度は、分離したい核酸の分子量により決めてください。

※2: TAE: 40mM トリス、40mM 氷酢酸、1mMEDTA

※3: TBE: 89mM トリス、89mM ホウ酸、2mMEDTA

※4: 特にゲル濃度が高い場合(2%以上) 注意が必要。加熱中は電子レンジから離れないようにしてください。

※5: ゲルトレイに使用されているアクリルなどの樹脂は、熱により変形の恐れがあります。60℃以下に冷ましてからゲル溶液を流し込みます。

ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY

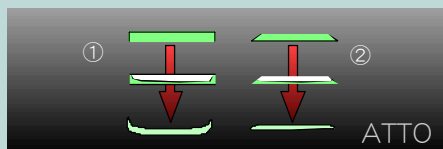
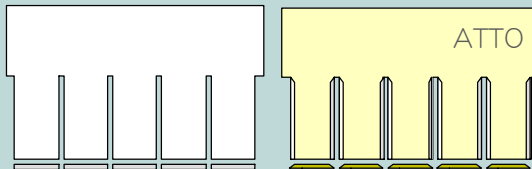
## コウムの形状

アガロースゲルのコウム形状を見てみると、通常、歯の部分の断面は長方形をしています。この形状のコウムでは、両端が盛り上がった形のバンドになります。歯の断面形状を台形にすると、バンド全体の厚みが揃い、シャープな泳動パターンが得られるようになります。アトーではこの形状を採用したコウムをアガロースゲル電気泳動装置に採用しています(AE-6100 型を除く)

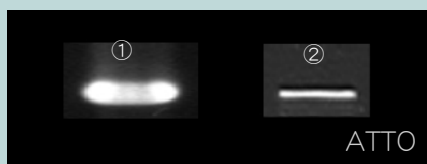
コウムの歯の断面形状のバンドパターンへの影響

①長方形断面のコウム

②台形断面のコウム

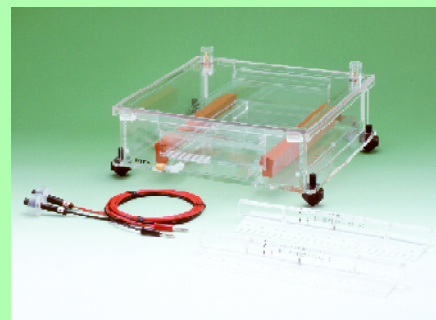


↑ウエル中のサンプル泳動イメージ



↑バンドの形状イメージ

コウム形状にまでこだわった!



アトーアガロースゲル電気泳動装置

AE-6111 26/13 検体 48,000 円

AE-6125 32/16 検体 58,000 円

AE-6133 42/21 検体 68,000 円

※製品詳細は弊社顧客部までお問い合わせください。

※通常のコウムを削っても、コウム形状が揃いにならないため、きれいなパターンが得られません。是非アトー社製品をご使用ください。

## 試料の調製

### ●ランニングバッファの調製

T E バッファに B P B (ブロムフェノールブルー:青)、X C (キシレンシアノール:緑)等のマーカー色素を入れ、ショ糖やグリセリン※6で比重を付け、サンプルバッファとします。マーカー色素は0.001~0.01%程度、薄く色がつく位の濃度にしませう※7。

### ●試料溶液の調製

試料をランニングバッファで希釈調製します。適度に希釈してアプライすることで、バンドがシャープになります。目安としては1バンドあたり10~100ng程度がよいでしょう。(右図は希釈時のバンドイメージ)

●試料は要時調製して下さい。希釈すると保存中に分解・吸着などで量が少なくなります。

### ●分子量マーカーを用意

分子量の推定だけでなく、電気泳動自体の良否の確認も行えるので、一緒に泳動することをお勧めします。

ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY

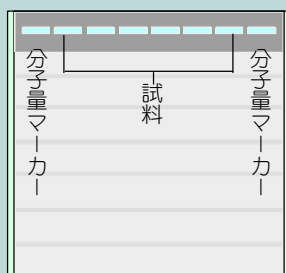
## サンプルアプライ

●全てのウェルにサンプルを添加します。またその時の添加容量を同じにします。各レーンへの電荷をそろえることでパターンが乱れることを防ぎます。

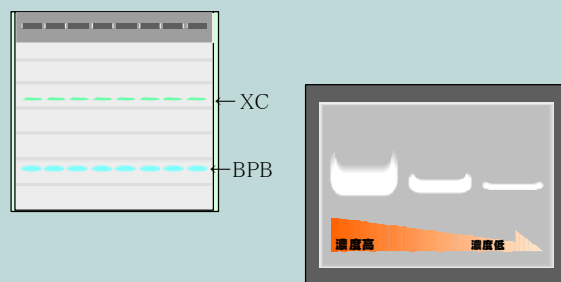
●基本的にマーカーは両側に添加します。レーン数が多いときは中心レーンにも流しておくことで分子量の計測精度が向上します。

### サンプル添加の模式図

両端に分子量マーカー、間に試料をアプライします。



### 泳動したときのマーカー色素の動き



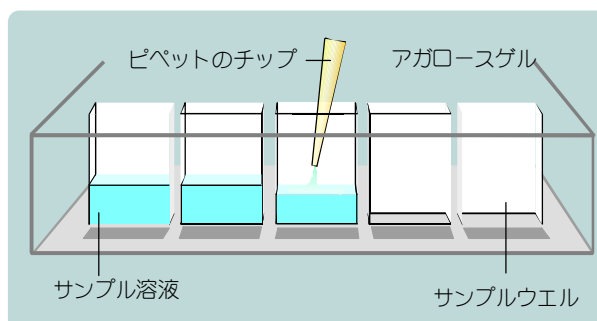
サンプル濃度と、バンドの形の関係

※6:グリセリンは弱い変成作用があり、まれに泳動パターンが乱れることがあります。その場合はショ糖を使用してください。

※7:マーカー色素が多いと泳動パターンの乱れや計測時のバックグラウンドの不均一などの原因になります。

●ウェルにサンプル溶液を注入する場合には、チップの挿入位置、サンプル液の注入スピード、最後の液の押し出しの有無など条件を同じにしてください。

●サンプル溶液の注入はなるべくゆっくり静かに行います。各レーン同じ場所から同じスピードで、同じ容量を入れてください。



ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY

## 電気泳動

### ●アガロースゲル電気泳動槽

アガロースゲルの電気泳動に使用されるサブマリンタイプの電気泳動槽は基本構造が単純であるため、ほぼ完成されています。従って、ゲルさえ普通に出来ていれば、マニュアルに従って使用することで綺麗なパターンが得られます。

### ●泳動用バッファ

ゲルが1~2mm沈む程度の量を入れてください。ただし、バッファ量が極端に少なくなる場合は泳動時間は短く、電圧も低めに設定します。

### ●基本的には電圧一定で電気泳動

外部から電源装置をつなげて使用する泳動槽の場合は、電極間距離(陽極と陰極の白金線の間の距離)に合わせ、5~10V/cmを標準にして定電圧条件で泳動してください。電極間距離20cmの場合は100~200V定電圧が標準設定です。

### ●長時間(2~3時間以上)泳動

バッファー還流や冷却を行ってください。バッファーの緩衝能の低下やイオン強度のムラによる泳動パターンの乱れを防ぐことができます。

### ●泳動用バッファは消耗品

要時調製して下さい。繰返し使用する時は還流や冷却を行ってください。

### ●ミュービッド

電源一体型の簡易泳動槽のため、設定項目は少ないですが、ゲルの出来、バッファの出来などで結果が大きく左右されます。基本に忠実な実験方法が望まれます。



# ゲルの染色

●染色はいつする？

アガロースゲルは後染めが理想的です※<sup>8</sup>。

●蛍光色素の選択は？

アガロースゲルで泳動した核酸の蛍光染色は主にエチジウムブロマイド(EtBr)が利用されています。分子量の小さいものや要求感度が高い場合はSYBR Greenなどの高感度のものを使用します。

●染色液の濃度は？

EtBr 染色液は0.5ug/ml 以下が標準濃度です※<sup>9</sup>。

●染色方法は？

ゲルをEtBr 染色液に浸し、振とうしながら染色5～30分染色します。エチジウムブロマイドはゲルへの浸透が早く、短時間の染色でも十分な感度が得られます。SYBR Greenは30～60分染色します。EtBr に比べるとゲルへの浸透性が低く、相対的に染色時間が長くなります。SYBR GoldはEtBr と同じ時間の染色で高感度が得られます。

●染色した後は・・・

バックが高い時は水道水に浸して30～60分脱色します。蛍光染色色素により、脱色が不要なものもあります。

●染色液は保存が利くの？

EtBr染色液の保存は遮光・室温で1週間以内に留めてください。SYBR Green/Goldはほとんど保存が利かず、使い捨てが基本です。

●蛍光染色試薬の安全性

EtBrなどの蛍光染色試薬は核酸に特異的に結合することから、発ガン性・変異原性などが報告されています。操作時は必ずグローブを着用してください、使用後は所定の廃棄手順を経て処理してください。

※<sup>8</sup>:ゲルに蛍光色素を入れて作製し泳動すると、バックグラウンドの不均一、泳動パターンの乱れの原因となります。

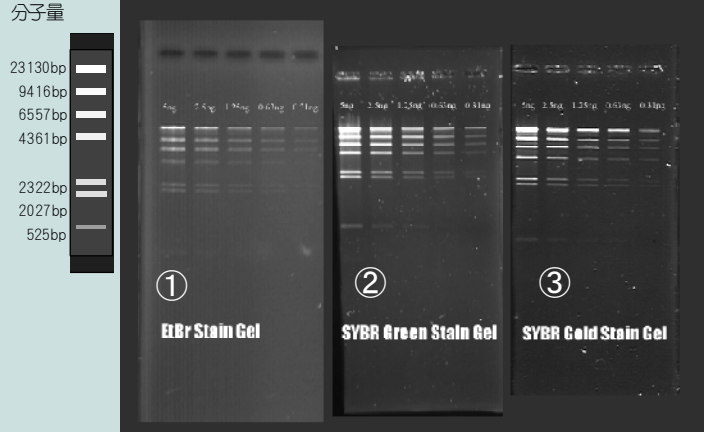
※<sup>9</sup>:EtBrを希釈する溶液は、使用済みの泳動バッファーまたは水道水を使用します。

●その他の蛍光染色試薬の特長比較

SYBR<sup>(R)</sup> Green I / SYBR<sup>(R)</sup> Green II / SYBR<sup>(R)</sup> Gold など

染色試薬の種類	DNA染色	RNA染色	感度 (分子量大)	感度 (分子量小)	染色性	危険性	ランニング コスト
エチジウムブロマイド EtBr	○	△	○	△	○〔良好〕	発ガン性	○
SYBR <sup>®</sup> Green I	○	△	○	◎	△	変異原性	×
SYBR <sup>®</sup> Green II	△	◎	○	○	△	変異原性	×
SYBR <sup>®</sup> Gold	○	○	○	○	○〔良好〕	変異原性	△

DNAの蛍光染色試薬感度比較データ



分子量(bp)	バンドあたりの量(pg)				
23130	2385	1193	596	298	149
9416	970	485	243	121	61
6557	675	338	169	84	42
4361	450	225	112	56	28
2322	239	119	60	30	15
2027	209	105	52	26	13
525	54	27	14	7	3
レーン総量(ng)	5	2.5	1.25	0.625	0.3125

ゲル中のバンドあたりのDNAの量算出方法  
バンドの量(pg)  
=レーン総量(ng) × (分子量 ÷ λ DNA全体の分子量) × 1000

電気泳動条件データ

サンプル: λ -Hind III DNA希釈系列  
(5ng, 2.5ng, 1.25ng, 0.625ng, 0.3125ng/lane)  
電気泳動: 0.8%アガロースゲル, 100V定電圧, 45分  
染色条件: ①0.5ug/ml EtBr染色液に浸し、振とうしながら30分  
: ②SYBR Green I 染色液に浸し、振とうしながら30分  
: ③SYBR Gold染色液に浸し、振とうしながら30分  
検 出: ①EtBr 312nmUV YA-3フィルター  
: ②SYBR Green 254nmUV OYフィルター  
: ③SYBR Gold 254nmUV OYフィルター  
撮 影: アトー プリントグラフ

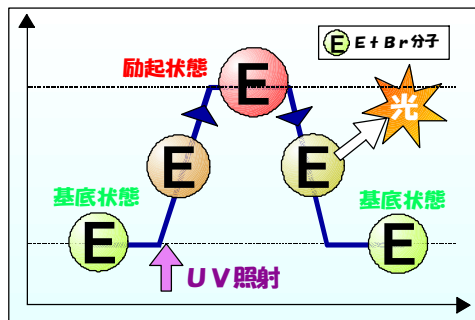
検出感度比較

EtBrは分子量「2027bp」の「26pg」まで検出できました。しかし、分子量「525bp」では「54pg」まで検出できました。SYBR Green/Goldは分子量「2027bp」の「13pg」のバンドまで検出できました。分子量「525bp」では「7pg」まで検出できました。  
SYBR Green/Goldは、EtBrと比べると分子量「2027bp」のバンドでは約2倍の感度、分子量「525bp」では約8倍の感度であることが分かります。  
このことから、分子量が大きい(2kbp以上)バンドの検出ではSYBR Green/Goldの優位性はあまりないようです。しかし、2kbp以下のバンドの場合は感度面で、SYBR Green/Goldに優位性が認められます。

## 蛍光検出・撮影

### ●蛍光の原理

EtBrに代表される核酸の蛍光染色では、紫外線照射により蛍光物質が励起され蛍光を発生します。EtBrなどの蛍光物質は核酸に特異的に結合し、その結合量は核酸の分子量、濃度に依存しています。つまり、分子量が大きく、量が多いバンドはより強く光り、反対に分子量が小さく、量が少ないバンドは蛍光が弱くなります。(蛍光検出の基本概念)



### ●検出感度と紫外線の波長との関係

紫外線照射装置を用いる場合、EtBrやSYBR Greenなどの蛍光物質では254nmの短波長が最も検出感度が高くなります。

### ●紫外線照射によるバンドの消失

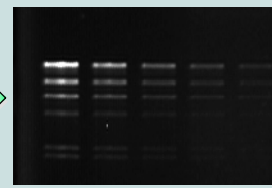
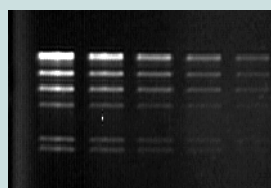
紫外線照射により核酸画分解され、蛍光が徐々に弱くなり、最終的にバンドは消失します。1ng以下のバンドは254nmの波長で1分程度で消失してしまいます。

### ●励起光源

蛍光物質を励起させる最適な光の波長は物質によって異なります。EtBr、SYBR Green/Goldでは250～310nmの紫外線を使用します。蛍光は、紫外線プロテクターを着用すれば目視が可能です。また、画像撮影装置での記録も可能となります。

### ●撮影用フィルター

画像撮影装置「プリントグラフ」や「ライトキャプチャー」で撮影する場合、蛍光色素に適した光学フィルターを選択する必要があります。詳細は撮影装置の取扱説明書を参照ください。



紫外線照射によるバンドの消失

アトーの画像撮影装置にはFREEZ機能があり、露出が決まったら画像をFREEZできるので紫外線照射時間を最小限に出来ます。

ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY

## 撮影装置

### ●蛍光ゲルの検出及びデータ取得にはゲル撮影装置を使用します

※10。

●蛍光色素染色をしたゲルは、ラップや紫外線透過型のアクリルトレイに乗せて紫外線照射装置の上に置きます。

### ●プリントグラフシリーズ

高感度モノクロCCDカメラを独自のカメラコントローラーで制御して、好みの検出感度で蛍光染色ゲルの撮影を行うことが可能です。適正な画像を得るためのフィルターの組み合わせや、用途に合わせた遮光キャビネットなどを備えています。予算や用途に合わせてさまざまなタイプからシステムを選択できます。(→価格900,000円～1,600,000円)

### ●ライトキャプチャー

プリントグラフと同様に、蛍光ゲル撮影が可能な画像撮影システム

です。ライトキャプチャーではカメラが冷却CCDカメラになり、化学発光検出まで可能としたものです。

(→価格2,050,000円～2,600,000円)

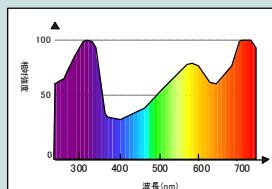


プリントグラフ

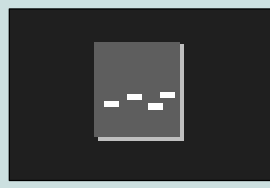
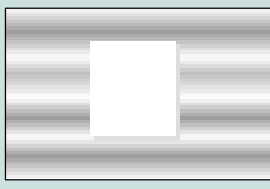
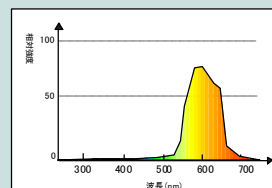


ライトキャプチャー

撮影システムのフィルターの効果

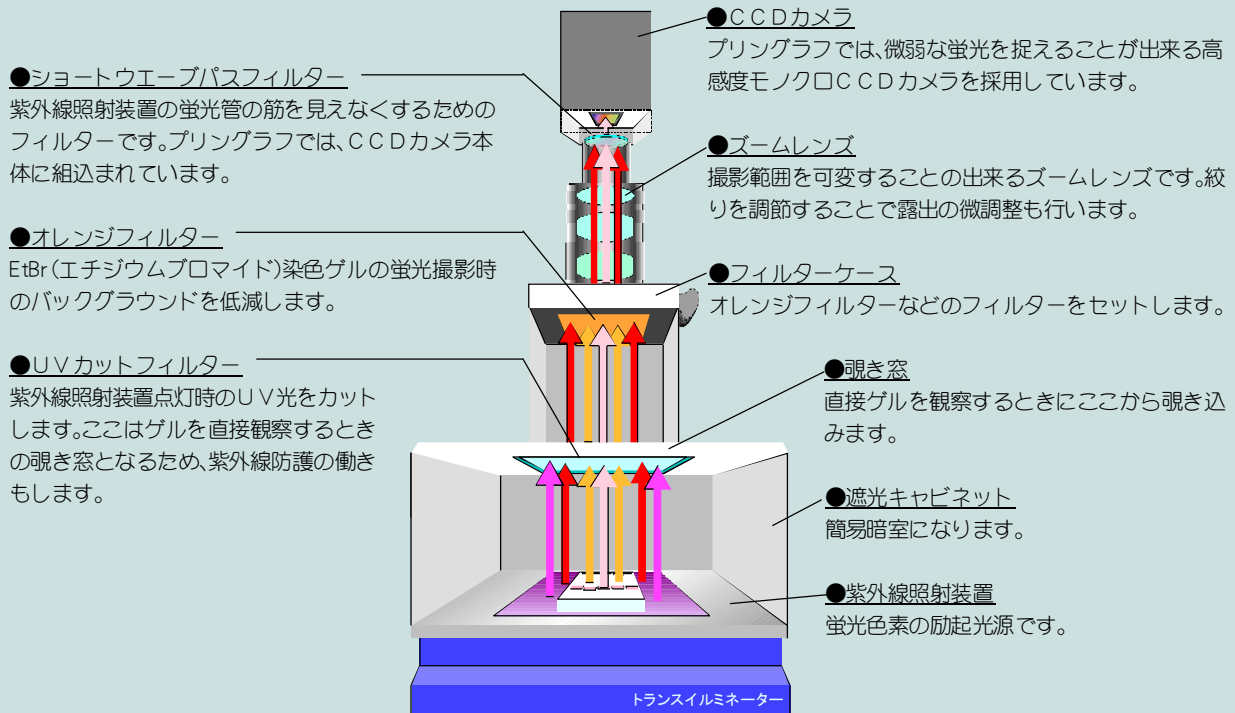


適正なフィルターを使用



※10:アトー蛍光ゲル撮影装置は、電気泳動のノウハウをもとに、蛍光染色ゲルの検出に伴う高感度検出、迅速なデータ出力、撮影画像のデジタル化などを実現しました。これらの装置は励起光源に紫外線照射装置(254nm～365nm)を用い、蛍光物質に最適な蛍光撮影フィルターを装備し、高感度CCDカメラとシャッタースピードコントローラーの組み合わせで装置を構成しています。蛍光ゲルの撮影・保存には是非上記製品をお使いください。

## プリントグラフの構造とフィルターの役割



ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY

## パターン解析

●**確実なパターン解析を行うために**  
画像解析ソフトウェアは便利な機能が付いていますが、定量データを出す場合には再現性が求められます。データの再現性を挙げる最も良い方法はきれいな電気泳動パターンを得ることです。ここまで記述してきた内容を参考にして、きれいな電気泳動パターンが得られる実験を行ってください。

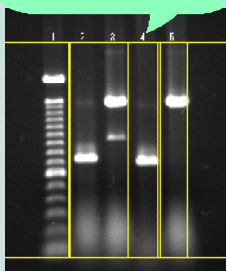
●**濃度定量**  
蛍光色素染色ゲルのバンドからは、濃度に比例した蛍光強度が得られます。この蛍光強度からバンドの濃度を数値化することが可能です。電気泳動パターン解析ソフトウェアはバンドの濃度を数

値化するためのソフトウェアです。  
濃度を数値化できれば、バンドの濃さを比較したり、濃度を求めることが可能です。

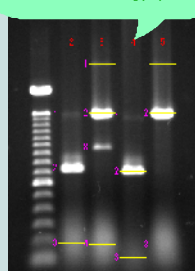
●**分子量の推定**  
分子量マーカーの各バンドの分子量と移動度を比較して検量線を作成すれば、目的バンドの分子量を推定することが可能です。

## アトー Lane Analyzer/CS Analyzerの主な機能

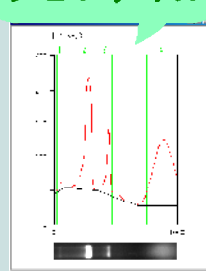
### レーン設定



### バンド検出



### プロファイル



### 計測結果

バンド番号	移動度	濃度
1	5304	1471
2	103788	737
3	23020	176
4	782400	2343
5	3847	2538
6	92446	1500
7	24347	888
8	57310	171
9	782400	5188
10	6358	1471

※製品に関するお問い合わせは下記弊社営業部までご連絡ください。

0.1=10 <sup>-1</sup>	deci	d	one tenth of
0.01=10 <sup>-2</sup>	centi	c	one hundredth of
0.001=10 <sup>-3</sup>	milli	m	one thousandth of
0.000 001=10 <sup>-6</sup>	micro	μ	one millionth of
0.000 000 001=10 <sup>-9</sup>	nano	n	one billionth of
0.000 000 000 001=10 <sup>-12</sup>	pico	p	one trillionth of
0.000 000 000 000 001=10 <sup>-15</sup>	femto	f	one quadrillionth of
0.000 000 000 000 000 001=10 <sup>-18</sup>	<b>ATTA</b>	a	one quintillionth of



# アトー株式会社

生化学・分子生物学・遺伝子工学研究機器  
開発/生産/販売/サービス

## 主要製品

- ペリスタポンプ
- クロマトグラフ
- 電気泳動分析機器

- DNA分析機器
- 画像分析システム
- 発光分析装置
- バイオ研究機器
- 医療分析装置

- 本 社 〒113-0034 東京都文京区湯島1-5-32 ☎(03) 3814-4861 (代表) ☎(03) 3814-4868
- ◆技術サービス ☎(03) 3814-4794 (代表) ☎(03) 3814-4856
- 技術開発 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-8 ☎(03) 5818-7560 (代表) ☎(03) 5818-7583
- センター (東京都許可 医療機器製造業)
- 大阪支店 〒530-0054 大阪市北区南森町2-1-7 ☎(06) 6365-7121 (代表) ☎(06) 6365-7125

■URL <http://www.atto.co.jp/>

■本 社 e-mail: [info@atto.co.jp](mailto:info@atto.co.jp)

■大阪支店 e-mail: [osaka@atto.co.jp](mailto:osaka@atto.co.jp)