

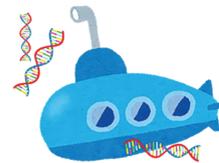
# アガロースゲル電気泳動

# 基本操作

2024年2月12日

## 1. アガロースゲル電気泳動とは

アガロースゲルを使用した電気泳動は、核酸を分析する手段として一般に広く使われている方法です。ゲルを緩衝液に沈めて電気泳動をすることから、海中の潜水艦（サブマリン）に例えて、この方法はサブマリン電気泳動といわれています。



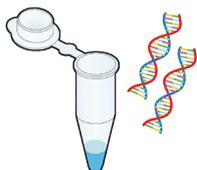
DNAを構成しているヌクレオチドはリン酸残基によりマイナスに荷電しています。アガロースゲルにDNA（試料）を添加し、緩衝液中で電気を流すと、DNAはプラス側（陽極）に移動します。この時、アガロースゲルの網目構造により大きなサイズのDNAはゆっくりと動くのに対して、小さいDNAはより速く動きます。この原理を利用してDNAを分離する方法がアガロースゲル電気泳動です。

タンパク質の電気泳動でよく使用されるポリアクリルアミドゲルも同じような網目構造を持ちますが、アガロースゲルの方がその網目が大きく、DNAの大きさによって使い分けをします。アガロースゲルは、約0.5～20kbpのDNAを分離するのに適しているといわれています。

今回は、アトーの製品を使用したサブマリン方式のアガロースゲル電気泳動の基本操作についてご紹介します。

## 2. 実験の流れ

### サンプル調製



細胞や組織、血液など様々な試料からDNAを抽出します。  
抽出したDNAをEzApplyDNAと混合し、泳動サンプルを調製します。

#### ローディングバッファー

WSE-7040 EzApplyDNA イージーアプライ DNA（試料溶液約50mL分）

### ゲルの作製



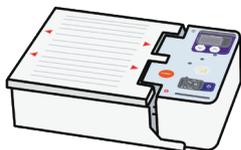
目的DNAの分離に適したアガロース濃度のゲルを作製します。  
EzRunTAEまたはEzRunTBEバッファーに秤量したアガロースを入れ、電子レンジまたは湯せんでアガロースを溶解します。

#### ゲルバッファー

WSE-7050 EzRunTAE イージーラン TAE（50×Conc.,500mL）

WSE-7051 EzRunTBE イージーラン TBE（10×Conc.,500mL）

### 電気泳動



サブマージ・ミニ（電気泳動装置）で電気泳動を行い、DNAを分離します。

#### 泳動バッファー

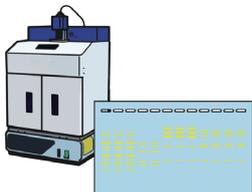
WSE-7050 EzRunTAE イージーラン TAE（50×Conc.,500mL）

WSE-7051 EzRunTBE イージーラン TBE（10×Conc.,500mL）

#### 電気泳動装置

WSE-1710 サブマージ・ミニ

### ゲルの染色・撮影



泳動後のゲルをEzFluoroStainDNAやEzPreStain DNA&RNAまたはエチジウムブロマイド（EtBr）で染色します。

染色後のゲルを蛍光撮影し、分離したバンドを確認、解析します。

#### ゲル染色液

WSE-7130 EzFluoroStainDNA イージーフロロステイン DNA（500μL）

WSE-7135 EzPreStain DNA&RNA イージープレステイン DNA&RNA（500μL）

### 3. 実験の前に

DNA、RNAを切断する酵素である **DNase**（デオキシリボヌクラーゼ, Deoxyribonuclease）や **RNase**（リボヌクラーゼ, Ribonuclease）は、自然界のありとあらゆる所に存在します。実験に用いる試薬や器具にヌクラーゼがコンタミすると、サンプルであるDNAやRNAが分解され、実験の失敗に繋がります。DNAやRNAを用いる実験を行う際はDNaseやRNaseに十分な注意が必要です。

必ず手袋を着用して  
実験しましょう



#### DNAを取り扱う上での注意

DNAを分解する酵素であるDNaseは、普段の我々の手にたっぷりと存在します。DNAを用いる実験を行う際は、必ずゴム手袋を着用し、適宜エタノールを使用します。

また、DNaseはオートクレーブの滅菌処理で不活性化することができます。なので、実験で使用するチップやチューブなどのプラスチック製品、サンプル調製や電気泳動で使用するバッファー類や蒸留水についても、必ずオートクレーブ処理を行ってから実験に使用します。ただし、電気泳動後にDNAのバンドを回収しない場合は、ゲルや泳動バッファーの滅菌は不要です。

#### RNAを取り扱う上での注意

RNAはとても敏感な核酸であり、RNaseによって迅速に分解されてしまうため、RNAを使用する実験はRNaseフリーの条件下で行うことが絶対です。RNAを分解する酵素であるRNaseは、失活しにくい上に、オートクレーブや紫外線（UV）照射、エタノールに対しても極めて高い耐性があるといわれています。実験の際に手にゴム手袋を着用することは絶対条件ですが、それ以外にも蒸留水やバッファーをDEPC処理しておく必要があります。

#### DEPCとは…

ジエチルピロカーボネート（Diethylpyrocarbonate, DEPC）はRNaseを失活させるための試薬です。DEPCは非常に強力なRNase阻害効果を持っており、RNAを扱う際に分解のリスクを避けるためによく用いられています。しかし危険物指定されている試薬であり、発がん性、引火性があるため、取り扱いには十分に注意し、作業はゴム手袋を必ず着用し、ドラフト内で行います。

#### DEPC水の作り方

- ① 密閉できる容器に滅菌済みの超純水を1000mL入れ、DEPCを1mL添加する（最終濃度0.1%になるようにDEPCを添加します）。
- ② 容器をよく振り、DEPCを溶解する。
- ③ 37℃で2時間以上置いておく（室温でオーバーナイトでも可）。
- ④ 容器のふたを緩め、オートクレーブ（121℃, 20分）をかけてDEPCを不活性化する。
- ⑤ オートクレーブ後、室温で保存する。

RNAの実験に用いる水やバッファー類には、必ずDEPC水を使用します。電気泳動で用いるゲルを作製するためのバッファーも必ずDEPC水で調製したものを使用します。

プラスチック製品や電気泳動槽も、RNaseフリー処理が必要となります。これらは、きれいに洗浄し、95%エタノールで軽くすすいでおきます。3%の過酸化水素水（超純水で作製したもの）で浸漬し、室温で15分ほど置いておきます。その後DEPC水で3回程度すすぎ、乾かすと器具のRNaseフリー処理ができます。

#### ちょこっと豆知識

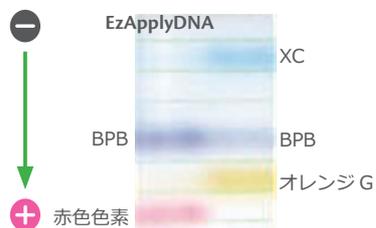
### ローディングバッファーの色素

ローディングバッファーには、サンプルをウェルに均等に沈ませるためのグリセロール等の比重添加剤と、サンプルに色を付けてゲルにアプライできているかを簡単に確認できるように色素が添加されています。色素は電気泳動の進行具合を確認したり、泳動距離の目安にするためにも非常に重要ですが、添加されている色素によって電気泳動の速度が異なります。どの色素を使用するかは、分離したいDNAの大きさや個人の好みによります（下表参照）。

色素名	色	移動度 <sup>※</sup>
Xylene Cyanol FF (XC)	水色	約 4kbp
Bromophenol Blue (BPB)	青色	約 300bp
Orange G	オレンジ	約 50bp

※ 0.5 × TBE/0.5 ~ 1.4% Agarose gel

電気泳動後のゲルと色素位置



アトーの **EzApplyDNA** には、BPBと赤色色素の2種類が添加されています（左図参照）。

特に赤色色素はオレンジGよりも速く進むため、泳動先端の指標となり、うっかり流しすぎてしまった！なんて失敗がなくなります。

さらに比重添加剤としてFicollを使用しているため、グリセロール添加バッファーよりも、明瞭でシャープなバンドを得ることができます。

コード No.	2332394
型式	WSE-7040
製品名	EzApply DNA イージーアプライ DNA
数量	1本
容量	10 mL (サンプル溶液約 50mL分)

EzApplyDNA  
製品情報



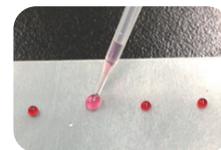
## 4. 実験方法

### 4-1. サンプル調製

- ① 細胞や組織などの試料から DNA 抽出キットを用いて、DNA を抽出します。
- ② EzApplyDNA (6 × 濃度) 1 μL に、抽出したサンプル 5 μL を加えて混合します。

【パラフィルムを使用して試料調製する場合】

パラフィルム上に EzApplyDNA を 1μL 滴下し、そこに抽出したサンプル 5 μL を加え、ピペティングで混合します (右図参照)。



### 4-2. ゲルの作製

サブマージ・ミニでは、ゲルトレイ (L) 1 枚あたり 25 ~ 40mL、(S) 1 枚あたり 15 ~ 20mL のアガロースゲル溶液が必要です。

アガロースゲル溶液量はゲルの厚さにより異なり、最適なゲル厚は 4 ~ 6mm です。ゲルが厚いとバンドがぼやけて見えたり、バックグラウンドが高くなる原因にもなります。

- ① 分離する DNA の大きさに応じて、アガロースを目的濃度になるように秤量します (下表参照)。

$$\text{ゲルバッファー量 (mL)} \times \text{ゲル濃度 (\%)} = \text{アガロース量 (g)}$$

例) 1.0% の L サイズのアガロースゲルを作製したい場合…

$$40\text{mL (ゲルバッファー量)} \times 1.0\% \text{ (ゲル濃度)} = 0.4 \text{ g}$$

0.4g のアガロースを 40mL のゲルバッファーに溶解する

アガロースゲル濃度 (w/v)	分離する DNA のサイズ (bp)
0.6%	1,000 ~ 20,000
0.7%	800 ~ 10,000
1.0%	500 ~ 7,000
1.2%	400 ~ 6,000
1.5%	200 ~ 3,000
2.0%	100 ~ 2,000

- ② ①にゲルバッファー (1 × EzRunTAE または 1 × EzRunTBE) を必要量添加します。
- ③ 電子レンジまたは湯せんで加熱し、アガロースを完全に溶解します。

※溶解後のアガロースゲル溶液は突沸する可能性があり、非常に高温のため、火傷をする恐れがあります。

必ず耐熱手袋をして作業してください。

※加熱中のアガロースゲル溶液の突沸を防止するために、溶液量の 2 ~ 5 倍の三角フラスコやピーカーを使用することをお勧めします。

- ④ アガロースゲル溶液を約 60℃ くらいまで冷まします。

※高温のアガロースゲル溶液をゲルトレイに流しこむと、ゲルトレイが変形することがありますので、必ず冷ましてください。

- ⑤ 適温に下がったアガロースゲル溶液をゲルトレイに流します。

※ゲル中に空気が入らないようにゆっくりと静かに注ぎいれます。

※空気が入ってしまった場合は、チップの先などでつついて、空気を除去します。

- ⑥ ゲル溶液が固まる前に、ゲルトレイにコウムをセットします。

- ⑦ ゴミが入らないようにラップをかけ、室温で 30 ~ 60 分静置してゲルを固めます。

作製したゲルは 1 × EzRunTAE または 1 × EzRunTBE バッファー中で約 1 週間、冷蔵保存が可能です。

### 4-3. 電気泳動

- ① 作製したアガロースゲルをゲルトレイごと電気泳動槽 (サブマージ・ミニ、電源搭載型電気泳動装置) に入れます。

※ゲルトレイについた余分なゲルは取り除いておきます。

- ② 電気泳動槽に泳動バッファー (ゲル作製に使用したものと同一バッファー) を 200 ~ 230mL 入れます。

サブマージ・ミニの電圧と時間の目安

- ③ 調製したサンプル溶液を空気が入らないように、ゆっくりアプライします。

- ④ 上部カバーをセットします。

- ⑤ 右表を参照し、泳動条件を設定して、スタートボタンを押して電気泳動を開始します。

設定電圧	設定時間
50V	60min
100V	30min
150V	20min

#### アトーのワンポイントアドバイス

泳動バッファーの量はゲルの上面より 1 ~ 3mm 上まで入れる!



泳動バッファーの量が多すぎると、ゲル上面部位のバッファー中を流れる電気が多くなるため、泳動時間が長くなります。

また、泳動パターンの乱れの原因にもなりますので、バッファー量の入れすぎには注意が必要です。

## 4-4. ゲルの染色と撮影

- ① 50mL の 1 × EzRunTAE または 1 × EzRunTBE に EzFluoroStainDNA または EzPreStainDNA&RNA を 5μL 添加し、混合します。  
 ※ EzFluoroStainDNA や EzPreStainDNA&RNA が完全に溶解せず、不溶物が見られることがあります。  
 その場合は、まず蒸留水 500μL で EzFluoroStainDNA または EzPreStainDNA&RNA 5μL を希釈し、  
 その後 1 × EzRunTAE または 1 × EzRunTBE を添加し、50mL の染色液を作製します。
- ② 上部カバーを外し、ゲルをゲルトレイごと取り出します。  
 ※電気泳動直後は、泳動バッファーが高温になることがあります。火傷に注意してください。
- ③ 樹脂製のタッパーに染色液を入れ、その中に泳動後のゲルを入れて、浸漬します。  
 この時ゲルトレイは外し、ゲルのみを染色液に入れます。  
 ※必ず樹脂製のタッパーを使用します。ガラス容器を使用すると、蛍光試薬がガラスに吸着します。
- ④ タッパーをアルミホイルなどで遮光し、室温で 10 ~ 30 分間インキュベーションします。
- ⑤ インキュベーション後、ヘラなどを使用して、ゲルを慎重に取り出します。  
 ※脱色操作は不要です。染色後の染色液は 4℃ で約 1 週間、遮光保存が可能です。
- ⑥ 取り出したゲルは、撮影用トレイまたはラップの上ののせます。
- ⑦ ゲル撮影装置にゲルをセットし、Cyan LED または UV 光源で励起し、撮影します（右表参照）。

UV 励起	
260 ~ 370nm	フィルター：500 ~ 580LP
Cyan LED 励起	
440 ~ 500nm	フィルター：500 ~ 580LP

## 4-5. 自作で試薬を調製する場合

下表は、アガロースゲル電気泳動で使用する主な試薬の組成です。  
 より再現性良く、簡便に実験を行う際は、ぜひアトーの試薬をご利用ください。

試薬名	組成
ローディングバッファー (5 × Conc.)	50% Glycerol, 1mM EDTA(pH8.0), 0.25% Bromophenol Blue, 0.25%, Xylene Cyanol FF
TAE バッファー (50 × Conc.)	2M トリス, 1M 酢酸, 50mM EDTA
TBE バッファー (10 × Conc.)	500mM トリス, 485mM ホウ酸, 20mM EDTA
染色液	10mg/mL エチジウムブロマイド, 1 × TAE または 1 × TBE バッファー

エチジウムブロマイド (EtBr) を染色に使用する場合は、以下のような手順で行います。

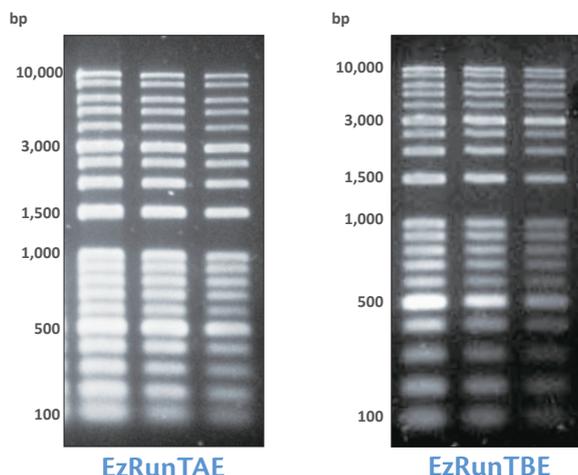
※エチジウムブロマイドは発がん性物質ですので、人体に接触しないように、取り扱いには十分気を付けてください。

- ① 50mL の 1 × EzRunTAE または 1 × EzRunTBE に 50μL のエチジウムブロマイド (10mg/mL) を添加し、混合します。
- ② 染色液にゲルを浸漬し、アルミホイル等で遮光しながら 5 ~ 30 分間、染色します。
- ③ 染色後、ヘラ等を使用して、ゲルを慎重に取り出します。バックグラウンドが高い時は、蒸留水に浸し、30 ~ 60 分脱色します。
- ④ ゲル撮影装置にゲルをセットし、UV 照射で撮影します。



### 実験例

#### 泳動バッファーの違い



アガロースゲル電気泳動で使用するバッファーは、TAE (Tris-Acetate-EDTA) バッファーと TBE (Tris-Borate-EDTA) バッファーの 2 種類が主流です。

10kbp 以上の大きな DNA を分離したい場合は、TAE バッファーを使用します。TAE は緩衝能が低いため、短時間の電気泳動に適しています。また、直鎖状二本鎖 DNA は TBE 中よりも TAE 中の方が 10% ほど早く移動するといわれています。価格は TBE よりも圧倒的に安価です。

1kbp 以下の小さな DNA で、泳動後に DNA を抽出しない、または回収率を気にしない場合には、TBE バッファーを使用します。TBE は緩衝能が高く、移動度が小さいので、小さいフラグメント (< 1kbp) に対してより高い解像度を得ることができ、バンドが鮮明になります。

左図は、EzRunTAE または EzRunTBE バッファーを使用した 1.5% アガロースゲルに分子量マーカーをアプライし、サブマージミニニを使用して 150V で 20 分間電気泳動した結果を示しています。

染色には EzFluoroStainDNA を用いて、Cyan LED 励起で撮影しました。このように、TAE バッファーは高分子の分離、TBE バッファーは低分子の分離に適していることがわかります。

## ちょこっと豆知識

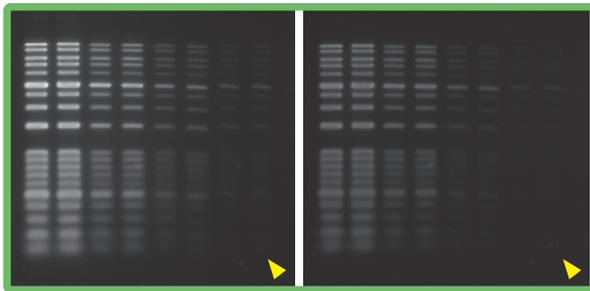
## アガロースゲルの染色

エチジウムブロマイド (EtBr) などによる蛍光染色では、紫外線 (UV) などの照射により蛍光物質が励起されて蛍光を発することで、バンドを可視化することができます。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や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、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。

EtBr 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。しかし発がん性物質である上に、励起に UV が必要であることから、EtBr によるゲル染色は非常に人体に危険な操作です。さらに UV 照射により核酸が分解されてしまうため、UV を照射し続けると蛍光は徐々に弱くなり、最終的にバンドは消失してしまいます。

アトーの DNA 検出用の蛍光染色試薬 **EzFluoroStainDNA** は、EtBr よりも低いバックグラウンドで高感度に検出が可能です。励起光に Cyan LED や青色 LED が使用できるので、UV より安全に感度良く検出が可能です。さらに LED 光源での励起は UV のように核酸を分解しないので、ゲル切出し後の核酸の集率が向上するというメリットもあります。

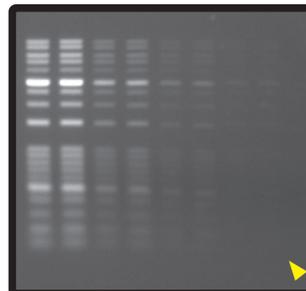
EzFluoroStainDNA で染色



Cyan LED 検出

UV 検出

EtBr で染色



UV 検出

左図は **EzFluoroStainDNA** と EtBr で染色したゲルを Cyan LED または UV で検出した結果を示しています。**EzFluoroStainDNA** で染色し、CyanLED で励起したものが 1 番高感度にバンドが検出できていることがわかります。

コード No.	2332395
型式	WSE-7130
製品名	<b>EzFluoroStain DNA</b> イージーフロロステイン DNA
数量	1 本
容量	500 $\mu$ L (使用時 10,000 倍希釈)

EzFluoroStainDNA  
製品情報

## サブマリン式アガロース電気泳動装置のご紹介

## 電源搭載型

## WSE-1710 Submerge-Mini サブマージ・ミニ

WSE-1710  
使用方法の動画

- 50V,100V,150V の切り替えが可能
- 0 ~ 99 分まで設定可能なタイマー付き
- エラー検知やアラームなどの安全設計
- 耐熱性 UV 透過トレイのゲル作製器 (L サイズ 2 個, S サイズ 4 個) 付き



電源搭載の小型サブマリン電気泳動装置です。PCR 産物の泳動確認など DNA の電気泳動をより早く、確実にやりたい方にお勧めです。

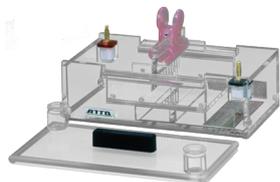
コード No.	WSE-1710 Submerge-Mini サブマージ・ミニ
23221000	
バッファ容量	200 ~ 230mL
タイマー	1 ~ 90min (0min: フリー)
泳動条件	出力 DC 50V/100V/150V 切替 (Max40W)
電源	AC100 ~ 120V 50/60Hz
コウム	S:5 検体・9 検体 L:12 検体・22 検体
トレイサイズ	S:54(W) × 60mm(L) L:110(W) × 60mm(L)
寸法、重量	190(W) × 130(D) × 60mm(H), 0.45kg

## サブマリン式アガロース電気泳動装置・電源のご紹介

## 小型 (10 検体)

AE-6100

## サブマージ・アガロース電気泳動装置 (小型)

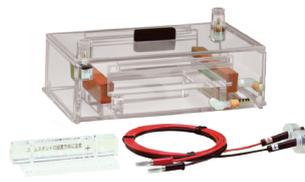
AE-6100  
使用方法の動画

コード No.	AE-6100 サブマージ・アガロース電気泳動装置 (小型)
2322153	
バッファー量	300 ~ 500mL
推奨泳動条件	100V, 60 ~ 90min ※別途電源が必要です
コウム	10 検体
ゲルサイズ	80(W) × 100mm
寸法、重量	190(W) × 100(D) × 80mm(H), 0.5kg

## 中型 (26 検体)

AE-6111

## サブマージ・アガロース電気泳動装置 (中型)

AE-6111  
使用方法の動画

コード No.	AE-6111 サブマージ・アガロース電気泳動装置 (中型)
2322178	
バッファー量	700 ~ 1200mL
推奨泳動条件	100V, 約 150min ※別途電源が必要です
コウム	26 検体, 13 検体
ゲルサイズ	120(W) × 160mm
寸法、重量	286(W) × 150(D) × 83mm(H), 1.5kg

## 小型電源

AE-8135

## マイパワーII 300



コード No.	AE-8135 マイパワーII 300
2311175	
出力範囲	電圧 1 ~ 300V 電流 1 ~ 400mA 最大電力 50W
タイマー	1 ~ 999min (1 分ステップ)
表示	電圧、電流、タイマー LED 3 桁
電源	AC100 ~ 115V 50/60Hz 70W
寸法、重量	74(W) × 170(D) × 170mm(H), 0.74kg

## 高性能電源

WSE-3100

## パワーステーションギブリ I



コード No.	WSE-3100 パワーステーションギブリ I
2311130	
出力範囲	電圧 0 ~ 500V 電流 0 ~ 3000mA 電力 0 ~ 200W
タイマー	1 ~ 999min (カウントダウン) ※タイマー OFF 時はカウントアップ
表示・操作	7 インチカラー液晶、感圧式タッチパネル
電源	AC100 ~ 240V 50/60Hz 300W 以下
寸法、重量	119(W) × 417(D) × 224mm(H), 6kg

WSE-3100  
使用方法の動画

## 関連試薬のご紹介

## サンプル調製バッファー

コード No.	型式・製品名	容量	数量
2332394	WSE-7040 EzApply DNA 調製済の DNA 電気泳動用ローディング溶液	10mL	1 本

## ゲル・電気泳動用バッファー

コード No.	型式・製品名	容量	数量
2332391	WSE-7050 EzRun TAE (50 倍濃縮)	500mL	1 本
2332392	WSE-7051 EzRun TBE (10 倍濃縮)	500mL	1 本

## DNA 蛍光染色試薬

コード No.	型式・製品名	数量	容量
2332395	WSE-7130 EzFluoroStain DNA 後染め用 DNA 蛍光染色液 (使用時 10,000 倍希釈)	1 本	500μL

本誌記載の製品仕様は予告なく変更する場合がありますので、ご了承ください。価格などの最新の情報などにつきましては当社ホームページでご確認ください。



## アトー株式会社

## 主要製品

- 発光・蛍光イメージングシステム
- 画像解析ソフトウェア ● 電気泳動装置
- 電気泳動関連試薬 ● ウェスタンブロット試薬
- ペリスタポンプ ● 細胞培養・観察システム

- 東京本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2 ☎ (03)5827-4861(代表) ☎ (03)5827-6647
- 大阪支店 〒530-0044 大阪市北区東天満2-8-1 ☎ (06)6136-1421(代表) ☎ (06)6356-3625  
若杉センタービル別館 5F
- 技術開発センター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 ☎ (03)5818-7560(代表) ☎ (03)5818-7563  
◆ メンテナンスサービスグループ ☎ (03)5818-7567(代表) ☎ (03)5818-7563

■ URL <https://www.atto.co.jp/>

お問い合わせ WEB会員登録の上お問い合わせフォームをご利用ください。

