

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

3-2-2 Motoasakusa Taito-ku Tokyo 〒111-0041
TEL 03-5827-4861 FAX 03-5827-6647
URL <http://www.atto.co.jp>

ATTO Corporation (Osaka)

2-8-1 Higashitenma Kita-ku Osaka City
〒530-0044
TEL 06-6136-1421 FAX 06-6356-3625

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(PAGE)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。

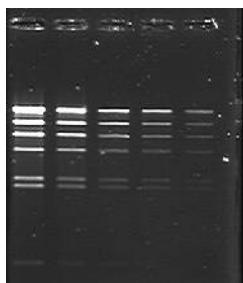
ここでは、色々な「染色する」の中から、感度や定量性などに優れる「蛍光色素染色法」について記述し、アガロースゲル電気泳動法をテキストに実験上のコツなどをまとめました。

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あります。

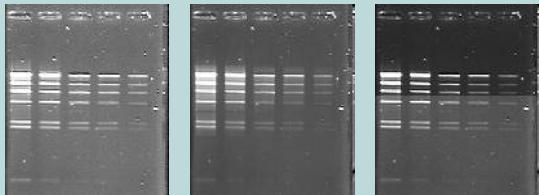
- バンドがシャープである
 - バックが低い（高S/N）
 - バックが均一である
 - 泳動がまっすぐ
 - 輝度と濃度に比例関係がある

● 薄度と浓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つ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。



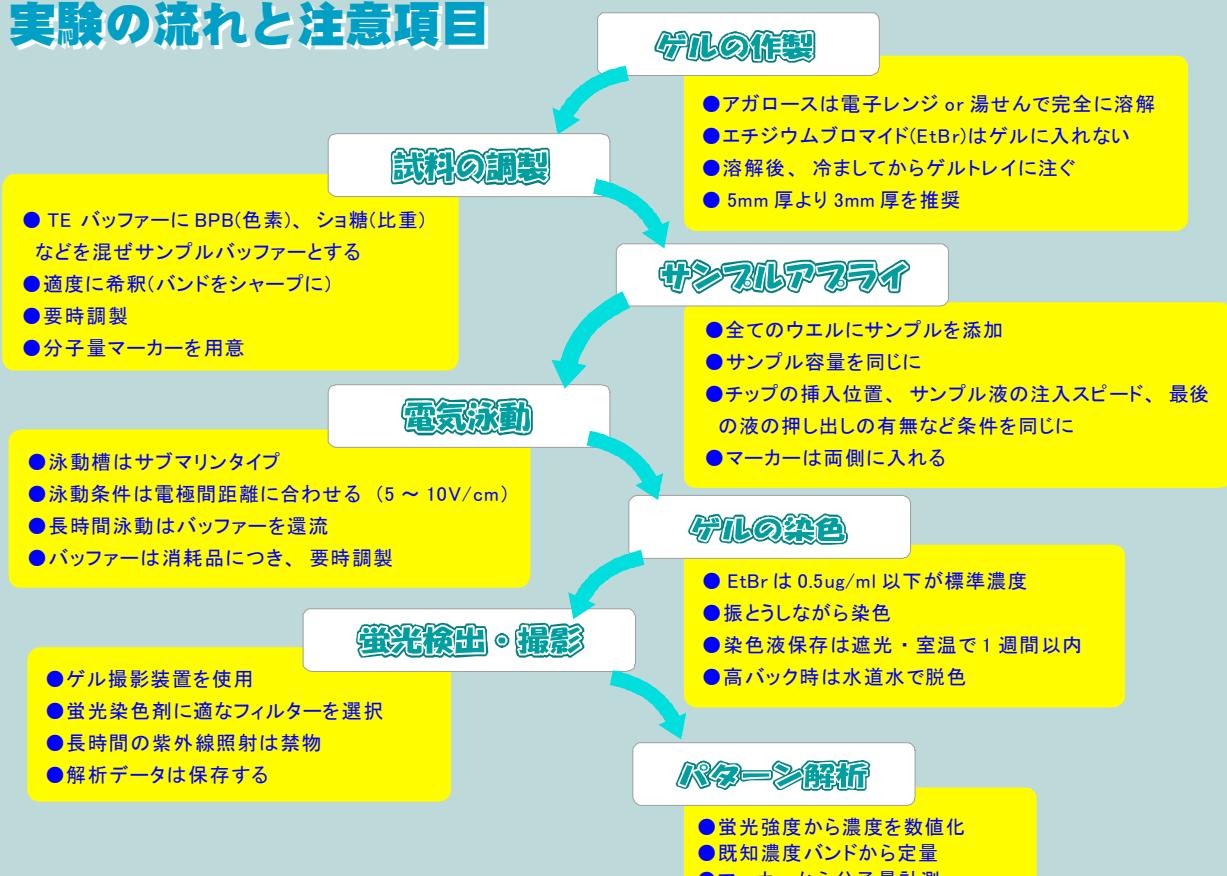
以上の画像は、実際の現象に似せる加工したものとす

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くたいと思います。

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^{*1}。

バッファー量：ゲルの幅(W)×長さ(L)×厚み(H)cm=A ml

アガロース量：A×ゲル濃度% = B g

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。

②T A E^{*2}またはT B E^{*3}/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。

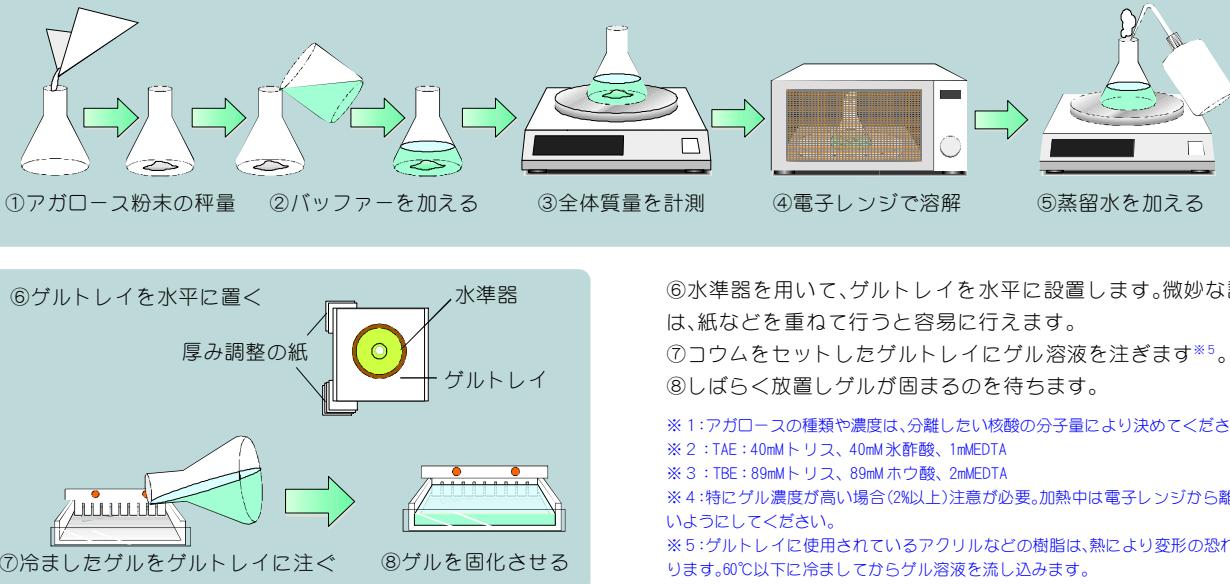
③アガロース、バッファーを三角フラスコに入れたら**全体の質量**

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^{*4}に注意してください。沸騰してたら停止させ、泡立てないよう攪拌し、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°C以下になるまで冷ましておきます^{*5}。

注意：ゲルにEtBr(エチブロ)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層パック」



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^{*5}。

⑧しばらく放置しひ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。

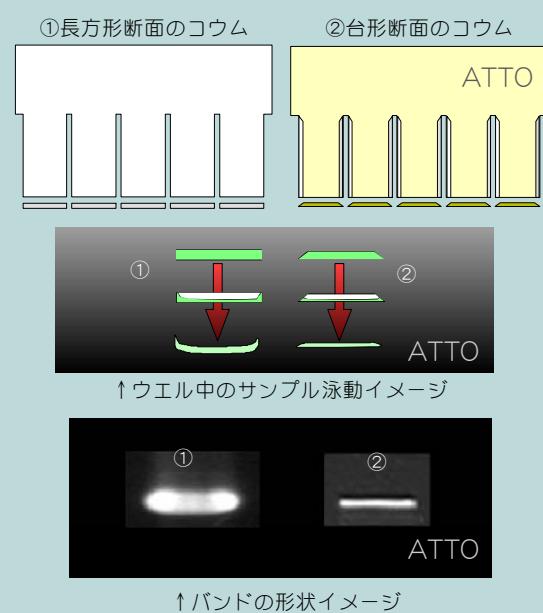
*5 :ゲルトレイに使用されているアクリルなどの樹脂は、熱により変形の恐れがあります。60°C以下に冷ましてからゲル溶液を流し込みます。

ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY ATTO BIOSCIENCE & BIOTECHNOLOGY

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なると、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



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

AE-6125 32/16 検体

AE-6133 42/21 検体

※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、コウム形状が不揃いになるため、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。

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^{*8}。

● 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プロマイド(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^{*9}。

● 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。エチジウムプ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。

● 染色した後には・・・

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。

^{*8}：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。

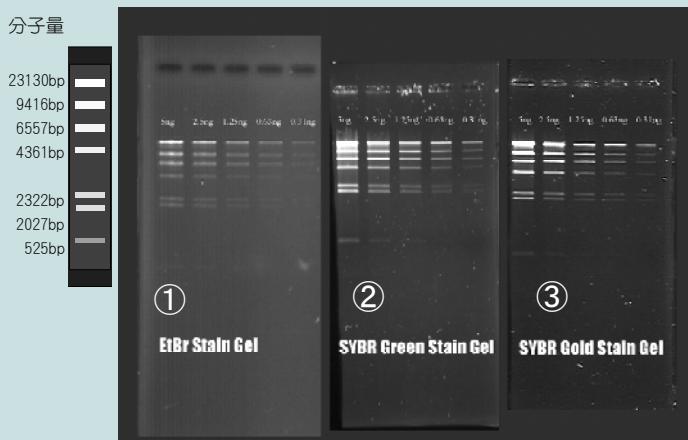
^{*9}：EtBrを希釈する溶液は、使用済みの泳動バッファーまたは水道水を使用します。

● その他の蛍光染色試薬の特長比較

SYBR^(R) Green I / SYBR^(R) Green II / SYBR^(R) 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
エチジウムプロマイド EtBr	○	△	○	△	○(良好)	発ガン性	○
SYBR ^(R) Green I	○	△	○	◎	△	変異原性	×
SYBR ^(R) Green II	△	◎	○	○	△	変異原性	×
SYBR ^(R) Gold	○	○	○	○	○(良好)	変異原性	△

DNAの蛍光染色試薬感度比較データ



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：① 0.5ug/ml EtBr染色液に浸し、振とうしながら30分

：② SYBR Green I 染色液に浸し、振とうしながら30分

：③ SYBR Gold染色液に浸し、振とうながら30分

検出：① EtBr 312nmUV YA-3フィルター

：② SYBR Green 254nmUV 0Yフィルター

：③ SYBR Gold 254nmUV 0Y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の優位性はありませんように。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。

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

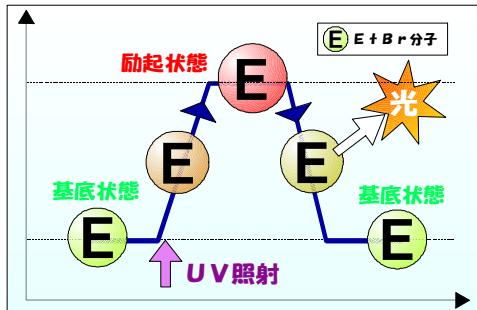
バンドの量(pg)

$$= \text{レーン総量}(\text{ng}) \times (\text{分子量} \div \lambda \text{DNA全体の分子量}) \times 1000$$

萤光檢出・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)



● 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

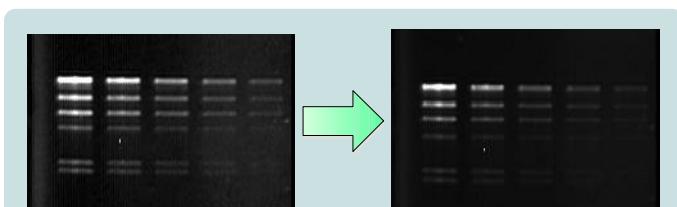
画像撮影装置「プリントグラフ」や「ライトキャプチャー」で撮影する場合、蛍光色素に適した光学フィルターを選択する必要があります。詳細は撮影装置の取扱説明書を参照ください。

●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。



紫外線照射によるバンドの消失

アト-の画像撮影装置にはFREEZE機能があり、露出が決まつたら画像をFREEZE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

摄影装置

- 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

- 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 780,000円~1,400,000円)

● Ez-CaptureMG

プリントグラフと同様に、蛍光ゲル撮影が可能な画像撮

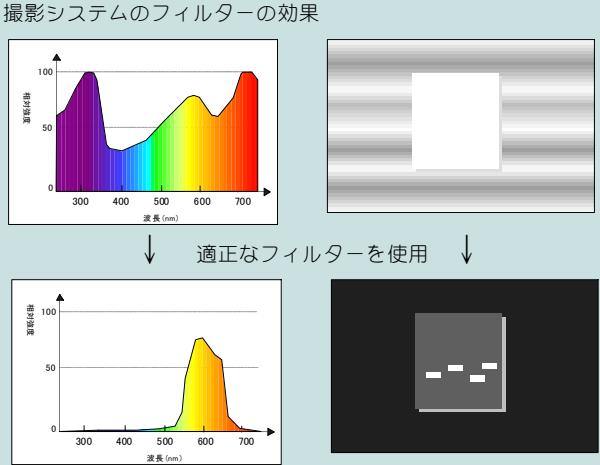
影システムです。Ez-CaptureMG ではカメラが冷却 CCD カメラになり、化学発光検出まで可能としたものです。
(→価格 1,680,000 円~)



プリントグラフ 2M

Ez-CaptureMG

※ 10 : アト-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

●ショートウェーブパスフィルター

紫外線照射装置の蛍光管の筋見えなくするためのフィルターです。プリントグラフでは、CCDカメラ本体に組込まれています。

●オレンジフィルター

EtBr(エチジウムプロマイド)染色ゲルの蛍光撮影時のバックグラウンドを低減します。

●UVカットフィルター

紫外線照射装置点灯時のUV光をカットします。ここはゲルを直接観察するときの覗き窓となるため、紫外線防護の働きもします。

●CCDカメラ

プリントグラフでは、微弱な蛍光を捉えることが出来る高感度モノクロCCDカメラを採用しています。

●ズームレンズ

撮影範囲を可変することの出来るズームレンズです。絞りを調節することで露出の微調整も行います。

●フィルターケース

オレンジフィルターなどのフィルターをセットします。

●覗き窓

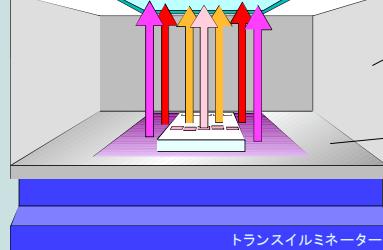
直接ゲルを観察するときにここから覗き込みます。

●遮光キャビネット

簡易暗室になります。

●紫外線照射装置

蛍光色素の励起光源です。



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。ここまでに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できます。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。

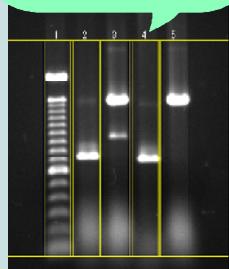
濃度を数値化できれば、バンドの濃さを比較したり、濃度を求めることができます。

●分子量の推定

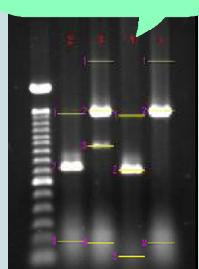
分子量マーカーの各バンドの分子量と移動度を比較して検量線を作成すれば、目的バンドの分子量を推定することが可能です。

アトーラインアライヤー/CSアライヤーの主な機能

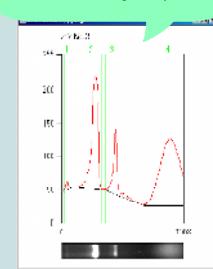
レーン設定



バンド検出



プロファイル



計測結果

マーク	標準	分子量
1	5504	1471
2	103708	732
3	123535	176
統合	282800	2378
λ-λα3	3842	2538
2	92446	500
3	26872	868
4	157310	171
統合	282800	5168
λ-λα4	5838	428

※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。

$0.1=10^{-1}$	deci	d one tenth of
$0.01=10^{-2}$	centi	c one hundredth of
$0.001=10^{-3}$	milli	m one thousandth of
$0.000\ 001=10^{-6}$	micro	μ one millionth of
$0.000\ 000\ 001=10^{-9}$	nano	n one billionth of
$0.000\ 000\ 000\ 001=10^{-12}$	pico	p one trillionth of
$0.000\ 000\ 000\ 000\ 001=10^{-15}$	femto	f one quadrillionth of
$0.000\ 000\ 000\ 000\ 000\ 001=10^{-18}$	atto	a one quintillionth of



アト一株式会社

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

■ URL <http://www.atto.co.jp/>

- 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 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2 ☎(03)5827-4861(代表) ☏(03)5827-6647
◆技術サービス ☎(03)5827-4873(代表) ☏(03)5827-4874
- 技術開発 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 ☎(03)5818-7560(代表) ☏(03)5818-7563
センター (東京都許可 医療機器製造業)
- 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

■本 社 e-mail:info@atto.co.jp

■大阪支店 e-mail:osaka@atto.co.jp