

Agarose for Electrophoresis

1. アガロースの使用例

1) DNA 断片の分離

アガロースゲルを用いた電気泳動については、多くの参考書に詳しく説明されている。ここでは、ニッポンジーンで行っている例を示した。

- ① 5 × TBE (Code No. 318-90041) を 5 倍希釈した TBE バッファー (89 mmol/l Tris-borate, 2 mmol/l EDTA) に目的の濃度になるようアガロースを加えて分散させる。この場合、バッファーを攪拌しながらアガロースを少しずつ加えると、きれいに分散する。特にアガロース H の場合は、アガロースを一度に加えると固まりができて、溶けにくくなることもある。
- ② 湯浴、ヒーター、オートクレーブ(120°C、1～2分間)、電子レンジなどでアガロースを完全に溶解する。
- ③ 50～60°C ぐらいまで室温に放置した後、コームをセットしたゲルトレイに注ぐ。あらかじめゲルトレイのすきまは、温めたパスツールピペットなどを用いて同じアガロースでシールしておくといよい。
- ④ アガロースが十分固化したら、ゲルの表面が浸る程度に TBE バッファーを注ぎ静かにコームを抜く。コームを乱暴に抜いたりすると、ウェルが壊れてきれいな泳動パターンが得られないので注意が必要である。
- ⑤ DNA サンプルに 1/10 量のローディング溶液 (Loading Buffer, Code No. 313-90111, 50% Glycerol, 0.02% Bromophenol Blue, 0.02% Xylene Cyanol, 1% SDS を使用できる、ただし SDS は、酵素反応を終了させる場合以外はなくてもよい) を加えて混合し、ウェルに静かに注入する。この時、必ず DNA 分子量マーカーのレーンも設ける。
Marker 1, 2, 3, 6 のような λ DNA の制限酵素断片を用いる場合は、ウェルに注入する直前に 65°C で 1～2分間加熱すると、 λ DNA の両端の粘着末端どうしのアニーリングが分かれるため、きれいな泳動パターンが得られる。(図 1)

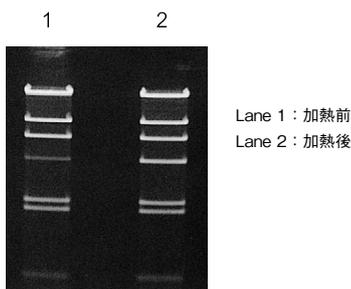


図 1 Marker 1 (λ /Hind III digest) の 65°C 加熱処理の影響

- ⑥ 定電圧 50～100 V (～5 V/cm) で 2～3 時間、泳動する。
- ⑦ 0.5 μ g/ml の臭化エチジウム溶液 (EtBr Solution, Code No. 315-90051) に泳動後のゲルを浸し、15～20分間放置して染色する。もし、大ざっぱにパターンを確認するだけであれば、最初からゲルに 0.5 μ g/ml になるように臭化エチジウムを加えておくと便利である。なお、臭化エチジウムは発がん性物質であるため、取り扱いの際は直接皮膚に触れないように手袋などを使用する。
- ⑧ 染色が終わり次第ゲルを取り出し、UV ランプまたはトランスイルミネーター (250～370 nm、短波長側は長時間の照射で DNA を傷つけるので注意) にて暗所で DNA パターンを観察する。写真を撮影する場合は赤色のフィルターを用いる。

2) DNA 断片の抽出

アガロースゲルから DNA を抽出する方法については種々の方法が報告されているが、いずれの場合でも、アガロース中の不純物(特に硫酸化合物)が DNA と共に回収されるために引き続いて行われる酵素反応がうまくいかないことがよくある。従って、一般に抽出 DNA 断片を効率よくベクターに結合させたりラベルしたりする場合には、抽出 DNA をゲルろ過(例えば Sephadex™ G-50)などにより精製することを奨める。しかしながら、反応効率がさほど問題にならないようなときには、アガロースより抽出された DNA をそのまま用いる。この場合、アガロースの純度が高いほど反応効率も上がる。また、大きな DNA 断片をゲルから抽出する場合に、 β -Agarase を用いて抽出する(プロトコール 1, 3 p.451, 452 参照)と、回収率も高く、DNA 切断もあまり受けずにすむ。

ここでは、Agarose L を用いて、DNA を抽出し、抽出 DNA の酵素反応性および大腸菌の形質転換への影響について示した。

- ① 1)の④までの手順で 1% ゲルを作製する。
- ② 3 μ g の pBR322 を 30 μ l 中で 10 units の Hind III により、37°C、20 時間反応させ切断し、これに 3 μ l の反応停止液(1)の⑤のローディング溶液)を加えて混合し、この 11 μ l をウェルに静かに注入する。
- ③ プロトコール集のプロトコール 3 (p.452)にて、DNA を抽出する。
- ④ 抽出 DNA の一部を、濃度既知の pBR322/Hind III の種々の希釈液と共に電気泳動後、0.5 μ g/ml の臭化エチジウム溶液で染色し、その輝度を比較しておおよその濃度を測定する。
以下に、そのようにして抽出した DNA について、
 - a) 制限酵素による切断
 - b) T4 DNA Ligase による再結合
 - c) 再結合 DNA による大腸菌の形質転換を行った結果を示した。

a) 制限酵素による切断

抽出 DNA 約 0.1 μ g を 1～4 units の制限酵素を用いて、37°C、20 分間反応させたものである。

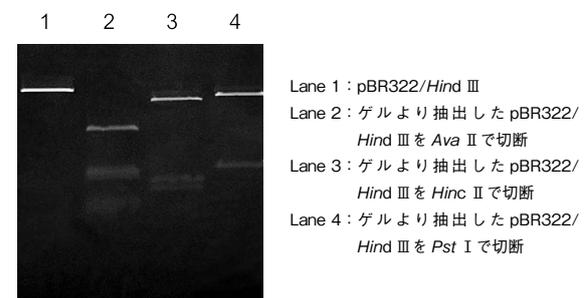


図 2 抽出 DNA 断片の制限酵素による切断

b) T4 DNA Ligase による再結合

抽出 DNA 約 0.1 μ g を 20 units の T4 DNA Ligase を用いて、4°C、16 時間反応させたものである。

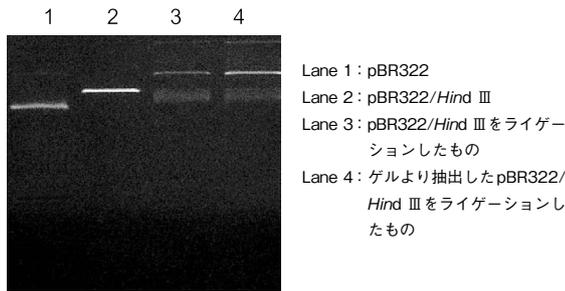


図3 抽出 DNA 断片の T4 DNA Ligase による再結合

c) 再結合 DNA による大腸菌の形質転換

b) で再結合した pBR322 にて、*E. coli* JM109 を形質転換した結果は次の通りであった。

- | | |
|----------------------------------|------|
| 1. pBR322 | 100% |
| 2. pBR322/Hind III | 6% |
| 3. 2. の pBR322/Hind III を再結合したもの | 60% |
| 4. 抽出した pBR322/Hind III | 58% |

なお、Agarose S、HS、21 および X から DNA を抽出することもできる。抽出の方法はプロトコル集のプロトコル 1 (p.451) を参照するとよい。

3) サザンブロッティング

アガロースゲル電気泳動で分画した DNA 断片を、直接ニトロセルロースなどのフィルターに移す、いわゆるサザンブロッティングは操作が簡単で、なおかつ分析が容易であることから、現在、広く利用されている。代表的なブロッティング方法を図 4 に示した。

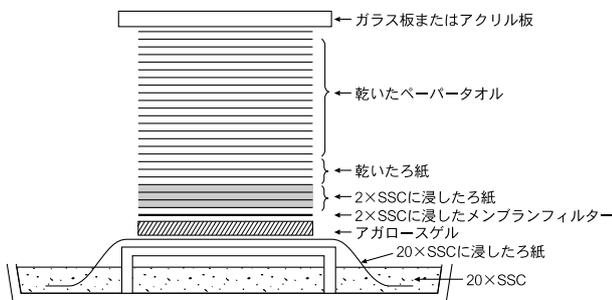


図4 サザンブロッティング

ここでは、アガロース H を用いてサザンブロッティングを行った例を示した。

- ① 1) の⑥までの手順で、0.3%ゲルにて電気泳動を行う。
- ② 0.5 μ g/ml の臭化エチジウム溶液にゲルを浸し、15～20 分間放置して染色し、長波長の UV を照射し、写真を撮影する。さらに、使用済のフィルムなどに DNA パターンをトレースしておくとおトラジオグラムとの比較に便利である。
- ③ ゲルを 0.2 mol/l HCl に浸し、室温で 20～30 分間ゆっくり振とうすると、BPB (Bromophenol Blue) が黄色に変色する。大きな DNA 断片はゲルから溶出されにくいいため、0.2 mol/l HCl にて部分切断して断片を短くするわけである。従って、アガロース S などを用いて数 kbp 程度の短い DNA 断片をブロッティングする場合には、処理時間を短くしたり省略しても大丈夫である。

- ④ 次にゲルを変性液 (0.5 mol/l NaOH, 1.5 mol/l NaCl) に移し、室温で 20 分間ゆっくり振とうした後、新しい変性液に交換し、さらに、20 分間振とうする。この処理で二本鎖 DNA が解離する。
- ⑤ 次にゲルを中和液 (0.5 mol/l Tris-HCl, pH 7.5, 3 mol/l NaCl) に移し、室温で 20 分間振とうする。さらに新しい中和液と交換して、20～30 分間振とうする。
- ⑥ ブロッティング台に大きめに切ったろ紙を図 4 のように置き、20 × SSC (3 mol/l NaCl, 0.3 mol/l Sodium citrate, Code No. 319-90015) にて湿らせる。ろ紙とブロッティング台の間の気泡は指でなでて追い出す。
- ⑦ ろ紙の上に、アガロースゲルを静かに気泡が入らないようにのせる。このとき、アガロースゲルは裏返して、電気泳動中下側だった面が上側にくるようにする。
- ⑧ メンブランをゲルの大きさに切り、水に一旦浸した後 2 × SSC (20 × SSC を 10 倍希釈したもの) に浸し、ゲルの上ののせる。指でなでてゲルとメンブランの間にある気泡を追い出す。
- ⑨ ゲルの大きさに切ったろ紙 2～3 枚を 20 × SSC に浸し、メンブランの上に重ねる。メンブランとろ紙の間に気泡が入った場合は指でなでて追い出す。
- ⑩ さらに 5～7 枚の乾いたろ紙 (ゲルの大きさに切ったもの) を重ね、その上にゲルの大きさに切ったペーパータオルを 4～6 cm 積み重ねる。
- ⑪ ガラス板を置いて、適当な重さの重しをのせる (5 g/cm²)。
- ⑫ バッファ槽に 20 × SSC を加えて、一晩静置する。
- ⑬ ブロッティングが終了したら、メンブランを注意深くはがし、0.1～2 × SSC にてアガロースを洗い落とし、風乾する。
- ⑭ メンブランは真空オーブン中で 80°C にて 2 時間処理した後、ハイブリダイゼーションなどに供する。ナイロンメンブランの場合は乾熱処理のかわりに UV を 2～5 分間照射するだけで、DNA がメンブランに固定されるので便利である。



図5 マウス細胞の DNA 5 μ g を *EcoR* I で消化後、0.7% Agarose S で電気泳動を行い、ニトロセルロースメンブランにブロッティングし、³²P 標識した cDNA をプローブとして、ハイブリダイゼーションを行った。オートラジオグラフィは 4°C で一晩行った。