

アガロースゲル電気泳動

2011/04/05

ここでは、核酸(プラスミドやDNA断片など)のアガロースゲル電気泳動について説明します。

Mini/midi prepで調製したプラスミドの純度・サイズ・濃度を確認したり、制限酵素処理したDNAやPCR産物の確認・精製に用います。タンパク質の電気泳動では、ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行います。DNAはタンパク質よりもサイズが大きいため、より目の粗いアガロースゲルを用います。DNAでも、数百bp程度の小さいフラグメントを分離したい場合は、ポリアクリルアミドゲルを用います。ここでは、よく使う0.5kb~10kb程度のサイズのDNAを分離することを想定して説明します。

ゲルの濃度

分離したいDNAのサイズに合わせて、ゲルのアガロース濃度を変えます(プラスミド等は、だいたい0.75%か1%でOKです)。大まかな目安を下に示しました。ローディングバッファーに含まれるBPB (プロモフェノールブルー)のおよその移動度も示しておきます。

0.6%	1-20kb	(BPB: 約1.5kb)
0.75%	0.8-10kb	(BPB: 約1kb)
1%	0.5-7kb	(BPB: 約0.5kb)
1.5%	0.2-3kb	(BPB: 約0.3kb)

バッファー等の調製

基本的にはTAE(Tris, Acetate, EDTA)バッファーで十分です。レシピを下に載せておきます。室温保存でOKですが、うちではバッファー用冷蔵庫にしまっています。

1xTAE bufferの調製

50xTAE buffer	10mL
milli Q	490mL

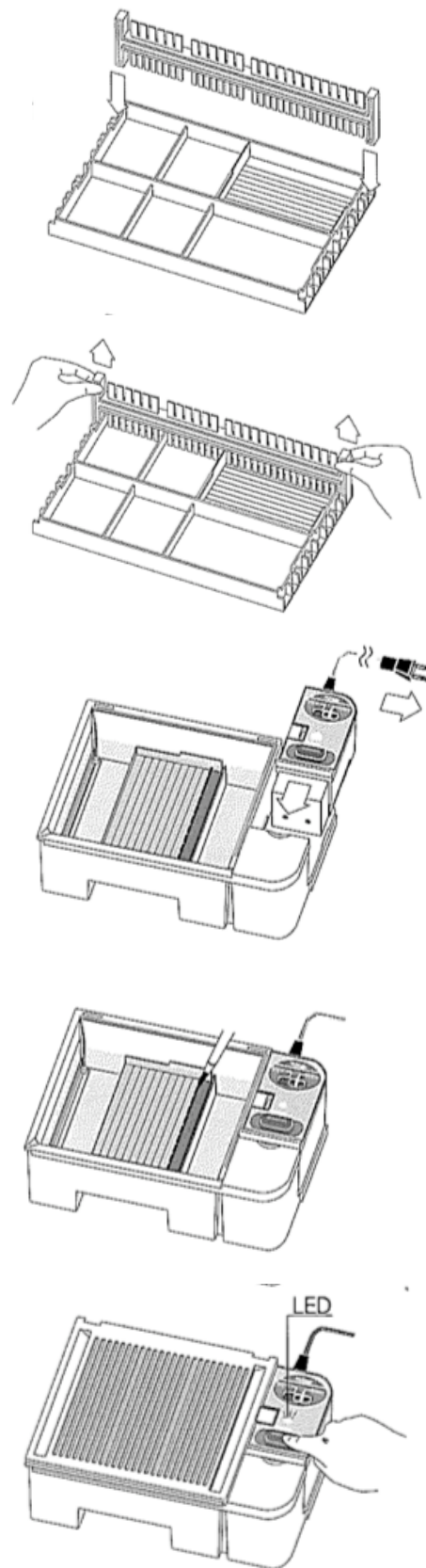
50xTAE bufferのレシピ

Tris base [K6]	121g
EDTA·2Na·2H ₂ O [K6]	9.3g
AcOH [K7]	28.5mL
milli Qで500mLに。pH合わせる必要なし。	

サンプルをゲルにアプライするときに使うloading bufferは、制限酵素等を買うとついてくるのであまり作る必要はないですが、一応レシピを載せておきます。グリセロールが入っているためにウェルに沈み、BPBが入っているために泳動の進行具合が目で見えます。

6x loading buffer (4°C保存)

BPB [K3]	2.5mg
----------	-------



milli Q	690 μ L
0.5M EDTA (pH 8.0) [バッファー用冷蔵庫]	10 μ L
glycerol [K7]	300 μ L

アガロースゲルの作成・電気泳動・観察

この部屋では、アガロースゲル電気泳動にMupid-2-plus(という商品)を使っています。これに付属しているゲル作成用の容器には、大小二つのサイズがあります。小さい方は、6 or 8レーン用で、13mLサイズです。大きい方は、12 or 16レーン用で、26mLサイズです。レーンを作るためのコームは、レーンの幅が細いのと太いので選べるので、自分の目的に合わせて選んでください。

ここでは、小さいサイズのゲルを作る場合を例として説明します。

- (1) アガロース [K3] (1%ゲルを作る場合、130mg)をビーカーや三角フラスコに量り取る。
- (2) TAE buffer [4°C バッファー類冷蔵庫]を13mL入れる(アプライする量が少なければ、10mLでもできます)。
- (3) ラップで軽く覆って、レンジで1-2min。
- (4) 手で触れるくらいに冷まして(5minくらい)、エチジウムブロマイド (EtBr, 10mg/mL stock, 4°C遮光保存)を1.3 μ L加え(x10000希釈)、揺らして混ぜて均一にする。
- (5) ゲル作成用容器(白)にゲル用トレイ(透明でライン入りのもの)をはめ、コームをセットする。そこにゲルを完全にさめないうちに流し込む。
- (6) ラップでホコリが入らないようにして、15minほど放置して固める。
- (7) 固まったら、電気泳動装置にのせる。装置の電源側が負極なので、ゲルのレーンがある方をそちらに向けます(DNAはリン酸基の電離で負に荷電しているから)。
- (8) TAE bufferをゲルの上2mm位まで注ぐ(250-300mLくらい使う)。
- (9) サンプルをアプライする。ゲルの厚さにもよるが、細いレーンだと最大10 μ Lくらいまで、太いレーンだと20 μ Lくらいまでアプライできる。
- (10) フタを閉めてスイッチを入れ、泳動を開始する(フタを閉めないと泳動されない)。20-40minくらいで、loading bufferに含まれるプロモフェノールブルーがゲルの先端にくるので、泳動を止める。
- (11) ビニール手袋をしてゲルをトレイごと取り出し、ゲルより一回り大きく切ったビニールにゲルを挟むか、載せる(トレイから押し出す)。
- (12) バンドを見るには、地下にある共通機器のFLA(蛍光スキャナ)を使うか、暗室で青色LEDゲル切り出し装置を使ってみるかします。

なお、合成用に使っているハンディUVライトでも見えますが、保護ゴーグルを使う等注意して下さい。また、ゲルから切り出して精製する場合は、UVは極力当てないようにします(UVでDNAが損傷し、形質転換できなくなる)。

- (13) (補足)ゲルの後染めについて

上で説明したプロトコルでは、あらかじめゲルにEtBrを加えておきました。別の方法として、ゲルにはEtBrを入れないでいき、泳動後にゲルをEtBr溶液に浸すという方法もあります。その場合は、EtBrストック溶液をTAEバッファーにx20000希釈で加え、そこにゲルを15-30分ほど浸してから観察します。