

臭化エチジウム (EtBr) に代わる核酸染色用試薬

目的

臭化エチジウム (EtBr) は簡便に核酸を染色することができるが、強い変異原性がある。EtBr に代わる染色試薬の性能を調べる目的で、それと EtBr を比較した。

実験の概要

この実験では当研究室で主に使用している 1.2%アガロースゲル、TAE Buffer、プレステインの条件下で EtBr と EtBr に代わる試薬 (GelRed) を比較した。

試薬

GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000× in DMF (Gel Red) ,Wako, 559-78731

臭化エチジウム (EtBr)

試薬の特徴

	GelRed	EtBr
変異原性 (Ames テスト)	非常に低い	高い
プレステイン	使用可	使用可
ポストステイン	使用可	使用可
検出用フィルター	EtBr または SYBR [®] Gold フィルター	EtBr フィルター
検出感度 (両者の比較)	高い	低い
凍結融解	安定	安定
特徴	DNA だけに特異的に結合する	DNA,アガロースともに結合する

手順

1. アガロースゲルを作製した。(1.2%,300ml 用)

300ml の TAE Buffer に、3.6g のアガロースを加え、加温してアガロースを溶解した。

50×TAE Buffer を作製し、希釈して使用した。

Tris 242g

酢酸 57.1ml

0.5M EDTA(pH8.0) 100ml

MilliQ 水 up to 1L

2. 少し冷ました後、それぞれの濃度の GelRed または EtBr を混合した。

染色試薬の濃度調整

GelRed はアガロース溶液 25ml に対し、2.5 μ l を添加する。これはメーカー推奨の濃度であり、この濃度を×1として、×1/2、×1/5、×1/10 の4種類の濃度のゲルを作製した。

EtBr は 10mg/ml 溶液を作製後、アガロース溶液 25ml に対し、2.5 μ l を添加する。これは推奨される濃度であり、この濃度を×1として、×1/2、×1/5、×1/10 の4種類作製した。

3. ゲル作製プレートに流し込み、凝固するまで静置した。

4. DNA Marker をそれぞれの濃度に調整し、ウェルにアプライした。

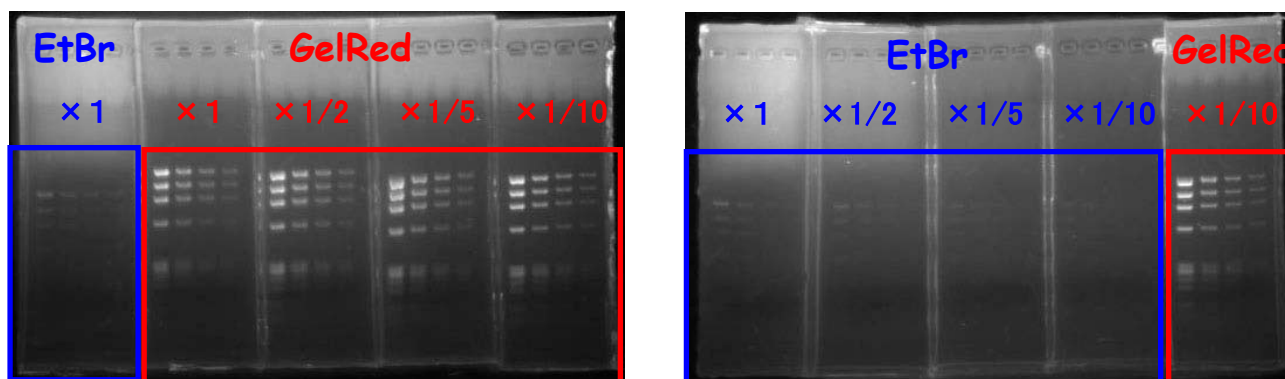
Marker の調整

Marker4 $\phi \times 174$ /HaeIII digest $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, Wako を $6 \times$ Loading Dye と混合し、 $0.3 \mu\text{g}$ 、 $0.15 \mu\text{g}$ 、 $0.075 \mu\text{g}$ 、 $0.0375 \mu\text{g}$ となるように調整した。

5. 100V で約 30 分泳動。

6. 紫外光で検出。(励起波長 λ_{Ex} / 蛍光波長 $\lambda_{\text{Em}} = 295\text{nm} / 595 \text{nm}$)

結果



Marker はそれぞれのゲルに対し、左から順に $0.3 \mu\text{g}$ 、 $0.15 \mu\text{g}$ 、 $0.075 \mu\text{g}$ 、 $0.0375 \mu\text{g}$ をアプライした。

GelRed は EtBr と比較し非常に高感度に核酸を検出でき、バックグラウンドも低い。しかし、EtBr は DNA とともにゲルにも結合するため、バックグラウンドが高く検出される。

GelRed の場合、希釈したゲルを用いると泳動速度が速くなる。また、Marker の濃度が高いものほど泳動速度が速い傾向がみられる。しかし、EtBr の場合、希釈したゲルを用いても Marker のバンドの位置はほぼ一定である。

考察

EtBr は感度が悪いが、十分な DNA 量がある場合は希釈したゲルを使用することが可能である。取り扱いには注意が必要であるが、安価で DNA サンプルに影響を及ぼさない染色試薬として常用できる。

GelRed は非常に高感度に検出するが、希釈して用いると、DNA 量によって移動度が異なる。メーカー推奨のプロトコールの場合、泳動パターンのはずれはなくなるが高価である。DNA 量が微量の場合の染色用に併用することは可能である。