

## アガロースゲル電気泳動

### 1 はじめに

遺伝子増幅技術である polymerase chain reaction (PCR) においては、反応産物など、核酸の大きさや量を確認する手段として電気泳動がしばしば用いられる。分子生物学あるいは遺伝子検査には欠かせない技術である一方、電気泳動の失敗によって結果が得られないという事例もしばしば聞かれる。ここでは特にPCR反応によって得られたデオキシリボ核酸(DNA)を念頭に、アガロースゲル電気泳動を実施する上での技術的留意事項について解説する。

### 2 アガロースの種類

アガロースは多くのメーカーから多種多様な製品が販売されている。各社の多様な製品群は電気泳動する物質(核酸、タンパク質)やその大きさなど、電気泳動の目的に応じて使い分ける。DNAの電気泳動用アガロースとしては、一般的には1 kbp (kilo base pairs, 1 kbp = 1000 bp)以下の短フラグメント用(以下、短フラグメント用アガロース)、1 kbp以上のフラグメント用(以下、標準アガロース)、高強度タイプ、低融点タイプが挙げられる。表に代表的なメーカーのアガロースを挙げた。PCR産物の電気泳動には短フラグメント用、または標準アガロースを使うことが多い。高強度タイプはプラスミドの電気泳動など低濃度のアガロースゲル(0.5~0.7%程度)を作成

する場合に用いる。高強度タイプのアガロースはPCR産物のような比較的短いDNAフラグメントの分離には不向きな傾向にある(図 Nippon Gene Agarose H)。低融点タイプのアガロースはゲル内で制限酵素反応を行ったり、電気泳動後にDNAを回収したりする場合に用いられる。

### 3 電気泳動バッファー

電気泳動にはトリス-酢酸バッファー(TAE)またはトリス-ホウ酸バッファー(TBE)を用いる。通常の核酸電気泳動ではTAEを用いることが多い。TAEを用いた場合、DNAは比較的早くアガロースゲル中を進行する。また、電気泳動後の核酸を回収するときもTAEの方が良いとされる。その一方TBEに比べ緩衝効果がやや弱く、発熱が多いため長時間の電気泳動には向かず、解像度も後述のTBEを用いた場合に比しやや劣る傾向にある。一方のTBEは短フラグメントの分離やパルスフィールドゲル電気泳動法の際に用いる。TAEに比して電気泳動時間がやや余分にかかるが、解像度が高くなる傾向にある。また、発熱が少ないため、冷却装置なしでもミニゲル電気泳動装置で100V、1時間程度の電気泳動が可能である。ただし、TAE、TBE何れも、発熱が泳動に悪影響を及ぼすような長時間(条件により時間は変動)の泳動には冷却装置が必要である。

#### 4 アガロースゲル濃度

分離したいDNAサイズによって濃度は決まる。多くの市販PCRプライマーを用いたPCR増幅産物（約100 - 500 bp）の確認であれば、2%の標準アガロースで分離、確認可能である（図 Takara L03 2.0 %）。また、500 bpを超えるようなPCR産物であれば1.5 %でもよい（図 Takara L03 1.5 %）。なお、標準アガロースは1 kbp以上の核酸分離用として販売されることが多いが、実際には1 kbp以下のDNA断片の分離にも使用可能である。一方マルチプレックスPCRの増幅産物のように、500 bp以下のフラグメントを複数確認する必要がある場合、3 - 4 %濃度の短フラグメント用アガロースゲルを用いる（図 Kanto HC 4.0 %）。短フラグメントを高解像度で分離する必要がある場合、標準アガロースは2 %以上の濃度では溶解しにくく、また解像度も十分ではないため用いない。

#### 5 アガロースの溶解方法

アガロースを溶かす時、いわゆるダマを作らないことと、泡によってあふれさせないことが重要である。ダマを作らないためには吸水した状態のアガロースパウダーを均等にバッファー中に懸濁させる必要がある。

バッファーにアガロースのパウダーを入れた際、底に沈殿するタイプ（TaKaRa L03など多くのアガロース）のアガロースの場合、そのまま室温でかき混ぜてもすぐに沈殿してしまう。そこで電子レンジを用いて少し加熱し、35 - 40°C程度に温めた状態で混ぜるとバッファー中にアガロース粒子が均等に拡散する。拡散させる前に加熱しすぎると、底の方にたまったアガロースが塊となり、溶解しにくくなる。

またNuSieve 3:1のようにバッファーに投入すると、塊になってしまいなかなか拡散しないタイプのアガロースもある。このようなタイプの場合、冷やしたバッファー（おおむ

ね20°C以下）にかき混ぜながら少しずつ加え、冷えた状態のバッファー全体に均等にアガロース粒子を拡散させることが必要である。気をつけて投入しても塊ができることが多いが、しっかりふたをして激しく振とうすることで、均等に拡散させることができる。十分に拡散させずに加熱した場合、塊部分がダマになり、なかなか溶解しない。

懸濁したアガロースを電子レンジで加熱すると多量に泡が立つ場合がある。そのまま加熱するとフラスコからあふれるので、泡が出始めたらいったん加熱を止める。泡が落ち着くのを待って再び加熱する。これを繰り返し、フラスコ全体が十分に熱くなり、泡がすぐに消えるようになると吹き出すことは少なくなる。アガロースの粒子がなくなるまで、しっかり加熱する。突沸することがあるので気をつける。Bubble Block（ニッポンジーン）という商品を用いるとほとんど泡ができませんので、ゲル作成が容易となる。又、トレーに流す際はおおむね70°C以下に冷えてから行う。多くのトレーは耐熱性ではないため、冷やさずに流し入れると熱によって不可逆的にひずむ。耐熱性トレーを使う場合も、沸騰した状態のゲルを流すことは避けた方がよい。トレー上で沸騰した部分に濃度むらができ、泳動像に影響することがある。

ゲルは溶かしやすさを考慮すると、少なくとも30 mL程度を一度に溶解することになる。使わなかったゲルは保存することもできるが、なるべく要時調製した方がきれいな泳動像が得られる。標準アガロースの場合、保存や再融解に比較的強く1-2週間での顕著な性能低下は見られないことが多い。一方、短フラグメント用アガロースの場合劣化が早いことが多く、保存は1週間以内にとどめた方がよい。また再融解によって顕著に性能低下する場合があることから、再融解は行わない。

## 6 ゲル厚

Mupid (Mupid-2 plus)のミニゲルでは、大きい方のゲルメーカー（通常17穴）で約25～30 mL、小さい方（通常8穴）で15 mL程度の量に溶解したアガロースを固めることで適正な厚さとなる。ゲルが厚い場合、染色に時間がかかる、バンドの染色が薄くなる、バックグラウンドが強くなったりするといった問題が起きることがある。しかし、電気泳動自体が失敗することはまずない。反対に非常に薄いゲルを使った場合、泳動とともにDNAがゲルの外に抜けてしまうことがある。この場合小さいフラグメントが失われ、大きいフラグメントだけ残ったような泳動像となる。

## 7 泳動時間

TAEバッファーで作成した2%アガロースゲルを用いるとおおむね100V 30分ほどで100 bpのフラグメントがゲルの端まで流れる

(図)。しかし、泳動速度は温度に依存しており、気温の高い夏では早く流れるが、冬は夏に比べてゆっくり流れる。電圧をかけたことによってバッファー温度が上がると泳動速度が速くなるため、電気泳動開始20-30分以上経過すると開始時より早く流れる傾向にあるので注意を要する。

## 8 染色（先染めと後染め）

ゲルにあらかじめエチジウムブロミド

(EtBr)を加えておく、いわゆる先染めの場合、泳動後直ちに写真撮影することができるため、迅速性に優れる。その一方EtBr汚染

(EtBrは発がん性が指摘されている)やマルチプレックスPCRのような複数のバンドを検出する必要がある場合、泳動距離に影響が出たり、EtBr枯渇によって後から流れてくる大きいフラグメントが十分に染まらなかったりする可能性がある。

他方、後染めの場合、EtBrによる汚染は最小限に抑えられるが、染色時間がかかること

と、染色時に揺すらずに放置した場合、染色むらが出やすい傾向にある。

どちらの染色方法を採用した場合でも、脱色時間は短くても良いことが多い。脱色を長時間行くと、小さいフラグメントが拡散して不鮮明になることがある。短時間の脱色でもバックグラウンドが気にならないよう、EtBr濃度を適切に保つことが重要である。

## 9 終わりに

アガロースゲル電気泳動は分子生物学的手法の基本であるが、教科書以外の情報源は意外と少なく、実験室に伝承された方法を漠然と継承する傾向にある。普段使っている条件で泳動像が明瞭でないなど、問題がある場合はアガロースの種類や溶解方法を見直すことできれいな泳動像を得ることができる可能性がある。

(文責：生物学部 鈴木匡弘)

表 代表的なアガロース

	標準アガロース	短フラグメント用	高強度タイプ	低融点タイプ
タカラバイオ	L03	PrimeGel Agarose PCR-Sieve	PrimeGel Agarose GOLD 3-40K	PrimeGel Agarose LMT 1-20K
ニッポンジーン	Agarose S	Agarose 21	Agarose H	Agarose L
関東化学	KANTO LE	KANTO HC	KANTO ST	KANTO LM
Lonza	SeaKem LE	NuSieve 3:1	SeaKem Gold	NuSieve GTG

2015年3月作成

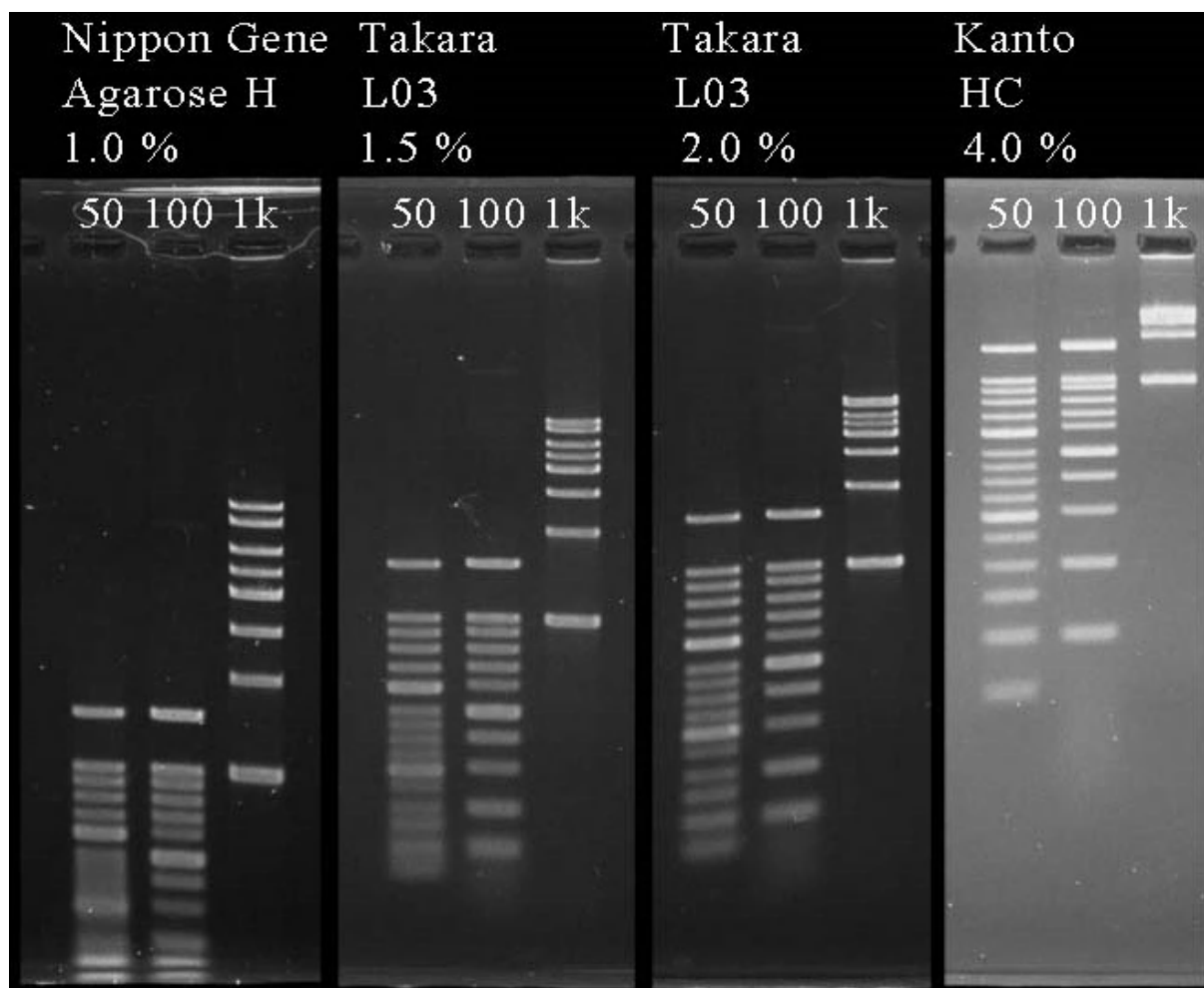


図 アガロース濃度による電気泳動像の違い

各アガロースを TAE バッファーに溶解し、MupidEX U 100 V 30 min 電気泳動、エチジウムブロミド 20 分染色、1 分脱色後撮影。濃度が低いアガロースゲル (Nippon Gene Agarose H 1.0 %) は大きいフラグメントの分離に向くが、1 kbp 以下のフラグメントの分離には不向きである。PCR 産物の分離には 1.5~2.0 % のゲルを用いることが多い (Takara L03 1.5 %, 2.0 %)。PCR 産物の大きさに応じてゲル濃度を調整する。500 bp 以下の小さいフラグメントを分離するには短フラグメント用のアガロースを用いる (Kanto HC 4.0 %)。なお、Kanto HC はややバックグラウンドが強い傾向がある。

50 : 50 bp ladder (1.5 kbp, 1 kbp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 450 bp, 400 bp, 350 bp, 300 bp, 250 bp, 200 bp, 150 bp, 100 bp, 50 bp)

100 : 100 bp ladder (1.5 kbp, 1 kbp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp)

1k : 1 kbp ladder (10 kbp, 8 kbp, 6 kbp, 5 kbp, 4 kbp, 3 kbp, 2 kbp, 1 kbp)

---

愛知衛研技術情報 第38巻第3号 平成27(2015)年 3月 30日

照会・連絡先 愛知県衛生研究所

〒462-8576 名古屋市北区辻町字流7番6号

愛知県衛生研究所のホームページ【<http://www.pref.aichi.jp/eiseiken>】

所 長 室 :	052-910-5604	生物学部長 :	052-910-5654
次 長 :	052-910-5683	ウイルス研究室 :	052-910-5674
研 究 監 :	052-910-5684	細菌研究室 :	052-910-5669
総 務 課 :	052-910-5618	医動物研究室 :	052-910-5654
企画情報部長 :	052-910-5619	衛生化学部長 :	052-910-5638
健康科学情報室 :	052-910-5619	医薬食品研究室 :	052-910-5639
		生活科学研究室 :	052-910-5643

代表 FAX : 052-913-3641

---