

ゲル作製～電気泳動～蛍光検出まで「なるほど！」のコツ (knacks & Tips) 情報が満載！

## *ATTO Technical Manual*



### **アガロースゲル電気泳動と 染色・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



#### Tokyo

3-2-2 Motoasakusa Taito-ku Tokyo 〒111-0041  
TEL 03-5827-4861 FAX 03-58274-6647  
URL <https://www.atto.co.jp/>

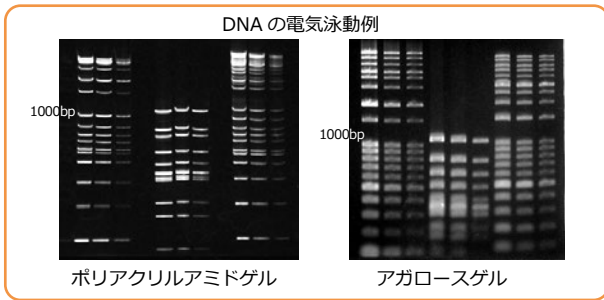
#### Osaka

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（PAG）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、基本的には分子量に応じて分離されます。これらを可視化する為に、核酸を染色する方法が一般的です。色々な「染色法」の中から、感度や定量性に優れた「蛍光色素染色検出法」についても含めて、核酸のアガロースゲル電気泳動法の実験上のコツなどをまとめました。

アガロースゲルとポリアクリルアミドゲル（PAG）の違いは大きくはゲルの孔径です。PAGの孔径は小さいので、概ね800bpを目安に大きいものはアガロース、小さいものはPAGがお勧めです。ただ、アガロースゲルは作製が簡単、装置が安価であるなどの理由により広く利用されているようです。



# 基本

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おりです。

- バンドがシャープ
- 泳動がまっすぐ
- バックが低く（高S/N）、均一（むらがない）
- 輝度と濃度に比例関係がある

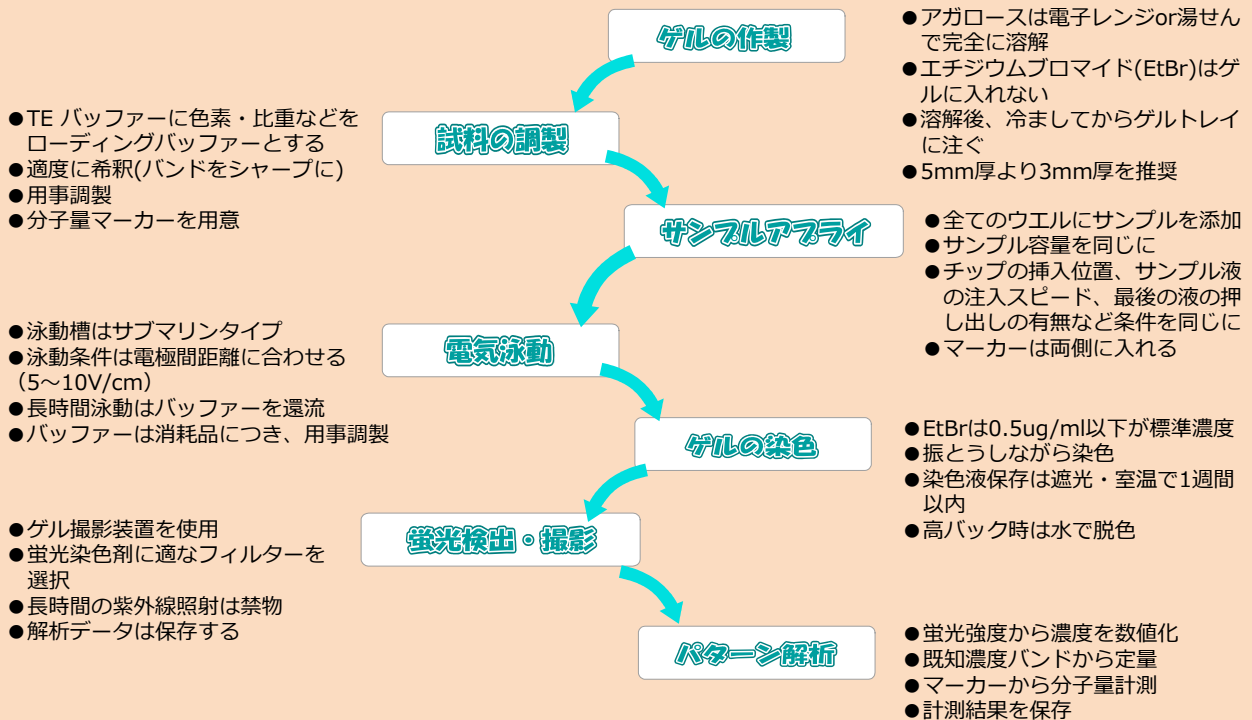
これらの条件を満たすためには、使用する装置の機能、実験の操作上のコツなどが重要です。実際にきれいなパターンを出すためにはどのようなことをすればいいのか？の参考にしてください。

# 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ています。

「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きたいと思えます。

## 実験の流れと注意項目



# 電気泳動

## ゲルの作製

ゲルの良し悪しが泳動結果を決めると言っても過言ではありません。アガロース粉末を加熱溶解し、トレイに流し込んで固めるだけ、というシンプルな作業ですが、試料に最適かつきれいなゲルを作製するように配慮しましょう。

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3～5 mmが広く使用されています。薄いほうがバンドがシャープになりますが、物理的強度は弱くなるので気をつけてください。

②TAE※2またはTBE※3バッファーをメスフラスコでA mL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。沸騰してきたら停止させ、泡立えないよう攪拌し、再度あたためます。

⑤アガロースが完全に溶けたら※5、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、ゲル濃度を保ちます。ゲル溶液は約60℃以下になるまで冷ましておきます※7。

⑥水準器を用いて、ゲルトレイを水平に設置します※6。微かな調整は、紙などを敷いてください。

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※7。

⑧しばらく放置しゲルが固まるのを待ちます。

※ ゲル濃度を正確にする為に秤量法を紹介しています

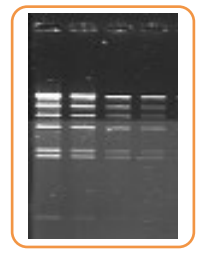
※1：アガロースの種類や濃度は、分離したい核酸の分子量により決めてください。概ね0.5～3%が用いられます。

ゲル濃度	分画範囲
0.6%	1.0～20kbp
0.8%	0.7～10kbp
1.0%	0.5～8kbp
1.5%	0.2～4kbp
2.0%	0.1～2kbp

※ 先染めと後染め

ゲルにEtBr（エチジウムブロマイド）を入れると、泳動後の染色過程を省略できますが、感度や定量性が低下する場合があります。入れる場合はゲルとバッファー両方に入れてください。バックグラウンドのムラの要因になります。

「EzPreStainDNA&RNA」については製品の取扱説明書を参照ください。



「失敗してしまった2層バック」

※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：溶液中のきらきらした粉末が見えなくなります。

溶解が不十分だとゲルむらの要因になります。

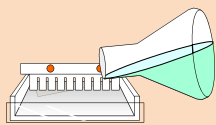
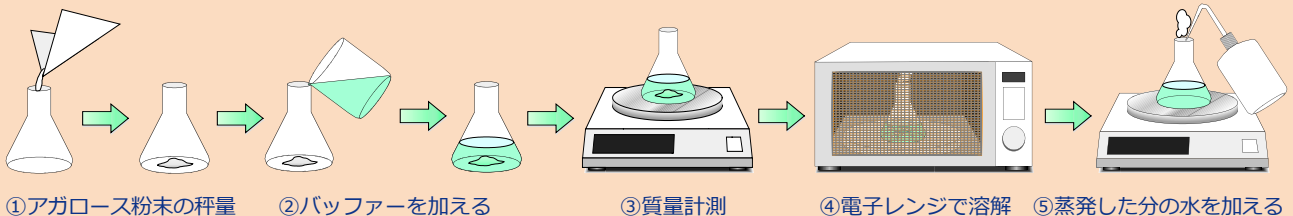
ゲル・泳動バッファー



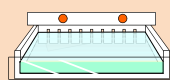
EzRun TAE



EzRun TBE



⑥水平に置いたゲルトレイに  
⑦冷ましたゲルを注ぐ



⑧ゲル固化

※6：ゲルトレイが傾いているとゲル厚が不均一になり、泳動パターンの異常要因になることがあります。

※7：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℃以下に冷ましてからゲル溶液を流し込みます。

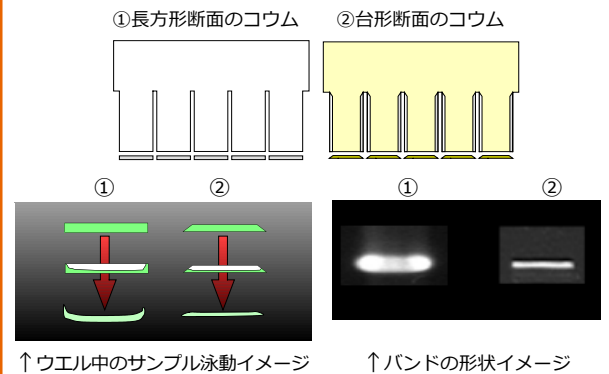
# 電気泳動

## コウム形状

ゲル作製時に試料をアプライするウェルを形成する為のコウムは、通常、歯の部分は長方形をしています。試料溶液やゲル、通電条件などによっては、泳動後のバンド形状が広がりやすくなります。これを防ぐために歯の断面形状を台形にし、バンド形状を整えシャープな泳動パターンが得られるよう出来ます。アトーではこの形状のコウムを「AE-6111型サブマージ アガロースゲル電気泳動槽」に採用しています。



### コウムの歯の断面形状のバンドパターンへの影響



## 試料調製

●ローディングバッファの調製  
TEバッファにBPB(ブロムフェノールブルー：紺)、XC(キシレンシアノール：空色)等のマーカー色素を入れ、ショ糖で比重を付け、ローディングバッファとします。マーカー色素は0.001~0.01%程度、薄く色がつく位の濃度にします※9。

●試料溶液の調製  
試料をローディングバッファで希釈調製します。適度に希釈してアプライすることで、バンドがシャープになります。目安としては1バンドあたり10~100ng程度がよいでしょう。(※10図は希釈時のバンドイメージ)アプライ量が同じになるように希釈・調製を推奨します。

●試料は要時調製してください。希釈すると保存中にDNA・RNAの分解・吸着など正確な結果が得られない場合があります。

●分子量マーカーを用意  
分子量の推定だけでなく、電気泳動自体の良否の確認も行えるので、一緒に泳動することをお勧めします。

## 試料アプライ

●全てのウェルに試料溶液を添加すること、添加容量を同じにすることを推奨します。各レーンへの電荷をそろえることでパターンが乱れることを防ぎます。

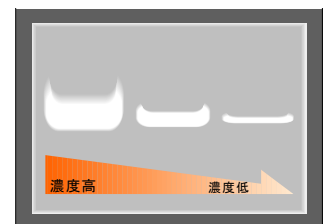
●基本的にマーカーは両側に添加します。レーン数が多いときは中心レーンにも流しておくことで分子量の計測精度が向上します。

●ウェルに試料溶液を注入する場合には、チップをウェルの上方から真直ぐ降ろすようにします。チップの挿入位置、サンプル液の注入スピード(ゆっくり静かに)、最後の液の押し出しの有無など条件を同じにしてください。

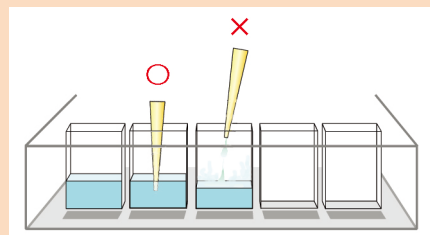
※9：試薬グレードや保存劣化により泳動パターンが乱れることがあります。「WSE-7040 EzApply DNA」は泳動先端に色素マーカーがあり、バンドがシャープになる比重液を採用しています。マーカー色素が多いと泳動パターンの乱れや計測時のバックグラウンドの不均一などの原因になります。特にXCはバンドと重なることが多いのでご注意ください。



※10：試料の濃度・絶対量が多くなるとバンドが太くなっていきます。



### 試料溶液のアプライ



チップはなるべくウェル底に近いところまで挿入し静かに試料溶液を押し出します。ウェル上部から落とし込むと試料溶液が拡散してしまいます。



# 電気泳動

## 通電

### ●アガロースゲル電気泳動装置

アガロースゲルの電気泳動に使用されるサブマリンタイプの電気泳動槽は基本構造はシンプルです。なので、試料・ゲル・バッファーが普通に出来ていれば、マニュアルに従って使用することで綺麗な泳動パターンが得られます。

①泳動用バッファーとして、ゲルを作製した同じバッファーを準備します。泳動槽に**ゲルが1~3mm沈む程度の量**を入れます。多過ぎると、バンドのシャープさが無くなったり、泳動時間が長くなります。

②ウェルに試料と分子量マーカーをアプライします。  
(前頁参照)

③通電条件を電源部・装置に設定し通電を開始します。試料アプライから通電までは時間をおかずに実施します。

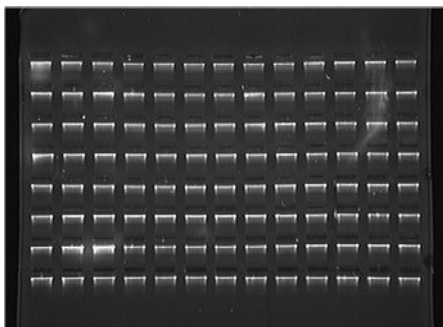
基本的には電圧一定で泳動します。

外部から電源装置をつなげて使用する泳動槽の場合は、電極間距離（陽極と陰極の白金線の間の距離）に合わせ、5~10V/cmを標準にして定電圧条件で泳動してください。電極間距離20cmの場合は100~200V定電圧が標準設定です。

④色素が泳動先端または予定の位置まできたら通電を停止します。または、バッファーやゲル・通電条件が同じであれば時間で停止しても大丈夫です。

### 多検体泳動例

コウムを8段セットし、104のウェルを作製



泳動槽：AE-6111 サブマージ アガロース  
ゲルサイズ：120×160mm

WSE-7120 サブマージ・マルチ も100検体泳動が可能です

※ ATTO Webサイトでは動画配信中！  
こちらも参照ください。

<https://www.atto.co.jp/products/agarose>



### ※ サブマリン

ゲルを泳動バッファーに沈むように設置する為、サブマリン=潜水艦方式とよばれています



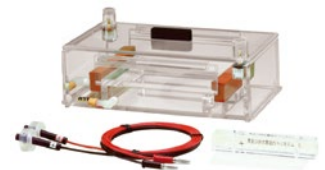
WSE-1710 サブマージ ミニ



AE-6100 サブマージ アガロース泳動槽



WSE-1720 サブマージ マルチ



AE-6111 サブマージ アガロース泳動槽

電源一体型（左）と泳動槽のみ（右）で電源装置と接続して使用するタイプがあります。

PCR産物やバンド(DNA)の有無の確認等のようにバンドの本数が少ない場合は泳動距離も短くてよいので小型の泳動槽を、RFLPのようにバンド数が多く泳動パターンを比較するようば場合は長い泳動距離を必要とするので大型の泳動槽がお勧めです。また試料・検体数が多い場合も大型の泳動槽で一度に泳動することが可能です。

他、緩衝能の低いバッファーや長時間の泳動、恒温化が必要な場合にはバッファーが循環できるタイプを使用してください。

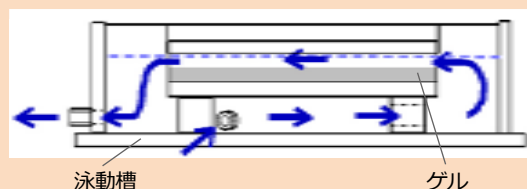
### ※長時間(2~3時間以上)泳動

バッファー還元や冷却を行ってください。バッファーの緩衝能の低下やイオン強度のムラによる泳動パターンの乱れを防ぐことができます。

### ※泳動用バッファーは消耗品

用事調製が基本です。繰り返し使用する時はコンタミやバッファーの劣化に気を付けてください。

### バッファー循環図



陽極+、陰極-のバッファーを循環することでイオンの偏りを無くします。また、恒温化した泳動バッファーをゲル全体を包むように循環することで温度ムラを防ぎます。

# 染色

●核酸の染色は蛍光色素を用いることがほとんどです。一般的な有色色素も使用可能ですが、感度が低い為使用頻度は少ないです。蛍光色素染色は主に安価で実績のあるエチジウムブロマイド(EtBr)が利用されています。1本鎖の核酸や要求感度が高い場合はSYBR Green/Goldなどを使用します。最近ではより安全性の高い蛍光色素が利用されます※10。アトーでは**EzFluoroStainDNA** イージーフロロステインDNA、**EzPreStainDNA&RNA** イージープレステインDNA&RNAを販売しています。

①蛍光染色試薬は発ガン性・変異原性などがる為、操作時は必ずグローブを着用してください※10。

②染色溶液を濃度むらの無いように調製します※11。

例、EtBr染色液は0.5ug/mL以下が標準的濃度

**EzStain**シリーズは泳動バッファーで1万倍希釈

③染色用トレイ（ガラス不可）を準備して染色溶液を入れ、泳動後のゲルを浸漬させます。染色時間は色素やゲル厚・大きさによって異なります。

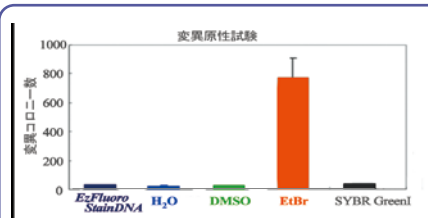
EtBrは概ね10~30分で染色が可能です。SYBR Greenは30~60分、**EzStain**シリーズは10~30分で染色可能です。染色中はアルミホイル等で遮光することを推奨します。

④バックグラウンドが低くなるまで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。**EzStain**シリーズは脱色不要です。

染色液、脱色した液は施設・自治体の指示に従って処理してください。

## ※10：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。使用後は所定の破棄手順を経て処理してください。「WSE-7130 **EzFluoroStainDNA**」「WSE-7135 **EzPreStainDNA&RNA**」は高感度で安全性の高い染色試薬です。



Ames 試験にて EtBr より低値を示しました。  
<左記グラフ参照>  
国際がん研究機関 (IARC) による発がん性リスク物質を含んでいません。

## ●先染めか後染めか

ゲルに蛍光色素を入れて作製・泳動すると、基本的に移動度は色素の分子量分ずれます。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ることもあるので注意してください。(2頁参照) 試料溶液 (DNA) に蛍光色素を入れた (結合させた) 場合も色素分の分子量が増え、検出感度が低下する場合があります。先染めが可能なものと推奨していないものがあります。各試薬の取扱説明書に従ってください。「**EzFluoroStainDNA**」は後染め専用、「**EzPreStainDNA&RNA**」は先染めも可能です。

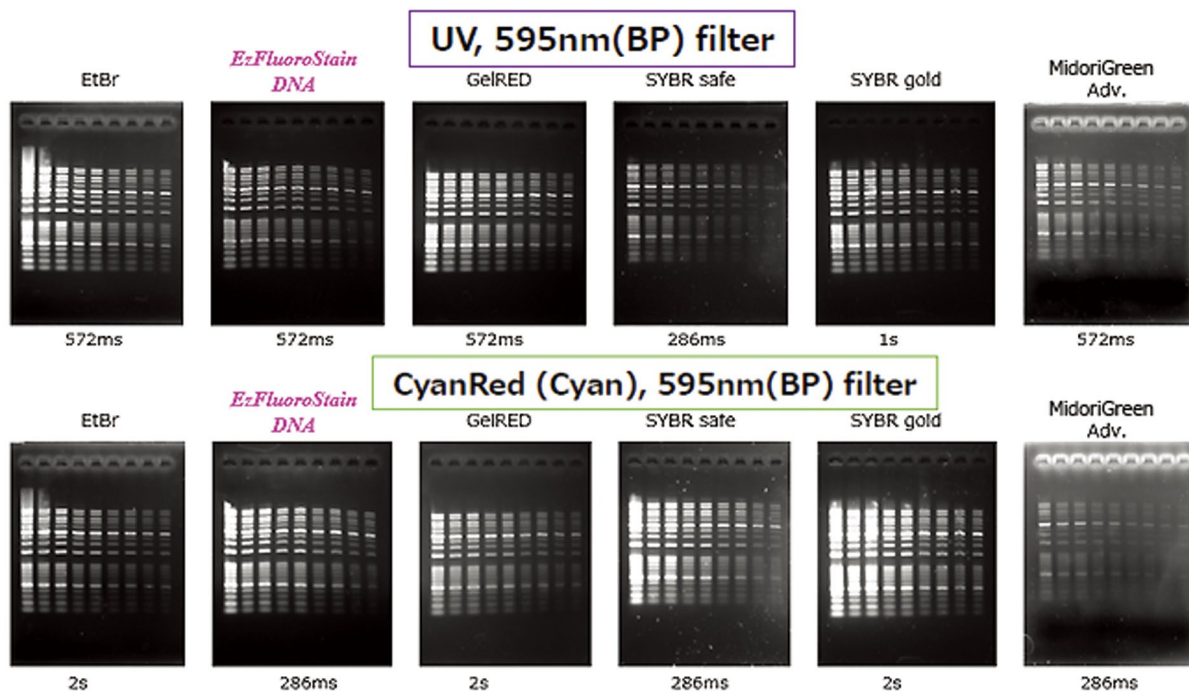
## ※11：染色液の調製・保存性

「**EzFluoroStainDNA**」「**EzPreStainDNA&RNA**」は冷凍庫から出して完全に透明な橙色、溶解した状態で調製してください。

EtBr染色液 (希釈したもの) の保存は遮光・室温で1間以内に留めてください。「**EzFluoroStainDNA**」「**EzPreStainDNA&RNA**」の染色液は遮光・冷蔵で1間以内なるべく早めに使用してください。SYBR Green/Gold等ほ概ね保存が不可で、使い捨て (用事調製) が基本です。

## ●蛍光染色試薬の比較

一般的な染色剤 EtBr (エチジウムブロマイド) との比較データです。EtBr より高感度の検出が可能です。励起光に UV (紫外線) を用いた場合と Blue LED 「Cyan LED」を用いた場合の比較データです。特に Cyan LED では高感度な検出が可能です。



# 蛍光検出・撮影

## 蛍光検出について

### ● 蛍光の原理(蛍光検出の基本概念)

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。

### ● 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250~370nmの紫外線を使用します。**EzStainDNA** シリーズはUVもしくはシアン・青色LED440~530 nmで励起して、500~600nmの蛍光により観察できます。

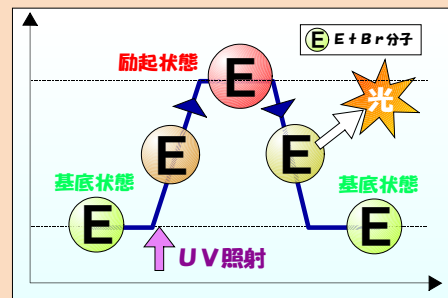
※**EzFluoroStainDNA** ピークEx: 250/370/482 nm, Em: 509 nm

**EzPreStainDNA&RNA** ピークEx: 270/497 nm, Em: 522 nm

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が、核酸が分解されやすくなります※12。人体にも有害ですので直接見たり浴びないように注意が必要です。フィルターを介したり紫外線プロテクターを着用して目視してください。また、アトーの検出・撮影装置にはFREEZE機能があり、露出が決まったら画像をFREEZEできるので紫外線照射時間を最小限に出来ます。

### ● 撮影用フィルター

検出時に余計な光をカットする為に種々の光学フィルターを用います。(右図および下記参照)

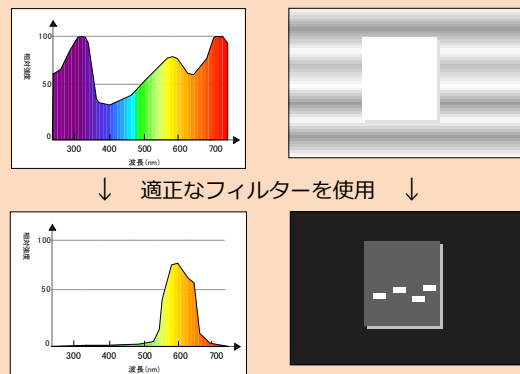


### ※12：紫外線取扱いの注意

紫外線照射により核酸が分解され、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。

近年は安全性の面からも紫外線に代わりLEDも利用されています。

### 撮影システムのフィルターの効果



光源	波長		フィルター
	<b>EzPreStainDNA&amp;RNA</b>	<b>EzFluoroStainDNA</b>	
UV	250~320 nm	260~370 nm	550nm <
青色LED	440~500nm		
シアンLED	470~520nm		

## 蛍光検出・撮影装置 構造とフィルターの役割

● 蛍光ゲルの検出及びデータ取得には蛍光検出・撮影装置を使用します。

励起光源の紫外線照射装置やLED照射装置と高感度カメラ、その間に適正なフィルターを通して蛍光物質=核酸を検出します。データは印刷やデジタルデータとしてPC等に保存します。

### ● ショートウエーブパスフィルター

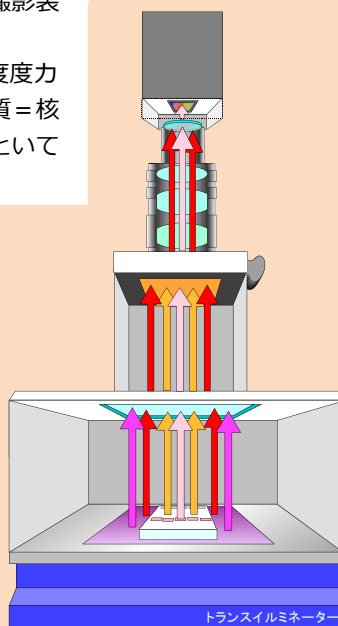
紫外線照射装置の蛍光管の筋を見えなくするためのフィルターです。「プリングラフ」では、カメラ本体に組み込まれています。

### ● オレンジフィルター

EtBr (エチジウムブロマイド) 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。



### ● カメラ

微弱な蛍光を捉えることが出来る高感度モノクロCCDカメラやCMOSカメラを採用しています。

### ● ズームレンズ

撮影範囲を変換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。



● 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・LED照射装置の上に置きます。暗室にして照射を開始し、適切な条件にて検出・撮影・データ保存・印刷をします。

◆ 「プリントグラフ」シリーズ

高感度CMOS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照射装置やフィルターの組み合わせ、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800,000円～)

◆ 「ルミノグラフ」シリーズ

ルミノグラフではカメラが冷却CCDカメラになり、化学発光検出も可能です。

(→価格1,998,000円～)



WSE-5300 プリントグラフ CMOS

WSE-5400 プリントグラフ Classic

アトー蛍光検出・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LEDや紫外線の照射装置を用い、蛍光物質に最適な蛍光撮影フィルターを装備し、高感度CMOS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。他、プリンターやゲルの切出し仕様、PCへの接続など用途に応じてシステムを選択できます。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。<詳細は別途製品のWebサイト、カタログをご覧ください>

# 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

数値化することが可能です。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。

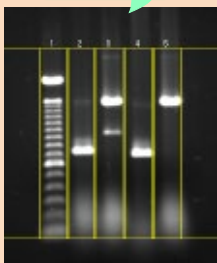
濃度を数値化できれば、バンドの濃さを比較したり、濃度を求めることが可能です。

● 分子量の推定

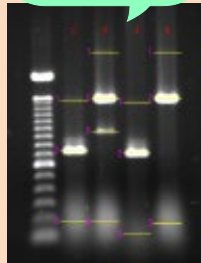
分子量マーカーの各バンドの分子量と移動度を比較して検量線を作成すれば、目的バンドの分子量を推定することが可能です。

## アトーの解析ソフトウェア「CS Analyzer」の主な機能

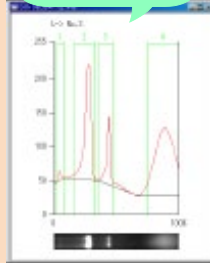
レーン設定



プロファイル



バンド検出



計測結果

バンド名	相対強度	分子量
標準1	5304	1411
2	103708	732
3	123828	176
標準2	230900	2378
標準3		
1	3642	2538
2	80446	1510
3	29342	958
4	157318	111
標準4	280946	5188
1	5336	1478



# アトー株式会社

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

- 発光・蛍光イメージングシステム
- 画像解析ソフトウェア
- 電気泳動装置
- 電気泳動関連試薬
- ウエスタンブロット試薬
- ペリスタポンプ
- 細胞培養・観察システム

- 東京本社 〒111-0041 東京都台東区元浅草3-2-2 ☎ (03)5827-4861(代表) ☎ (03)5827-6647
- 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
- 技術開発センター 〒110-0016 東京都台東区台東2-21-6 ☎ (03)5818-7560(代表) ☎ (03)5818-7563  
◆ メンテナンスサービスグループ ☎ (03)5818-7567(代表) ☎ (03)5818-7563

■ URL <https://www.atto.co.jp/>

お問い合わせ WEB会員登録の上お問い合わせフォームをご利用ください。

2023. 9