

## GelStar®, SYBR® Green I, II核酸ゲル染色によるDNAの検出

## 電気泳動後のDNAの染色方法

1. GelStar® または SYBR® Green 染色の濃縮ストック溶液を冷凍庫から取り出し、室温で融解します。
2. 微小遠心分離用チューブで溶液を遠心分離し、チューブ底部の染料を回収します。
3. 透明のプラスチック製ポリプロピレン容器でpH 7.5 ~ 8.5の緩衝液を使い、10,000X濃縮液を1X希釈標準溶液 (1 µl / 10 ml) に希釈します。ゲルの上面を覆うのに十分な染色溶液を用意します。
4. ゲルを電気泳動チャンバーから取り出します。
5. ゲルを染色溶液に浸します。
6. 室温でゲルを静かにかき混ぜます。
7. 15~30分間ゲルを染色します。最適な染色時間は、ゲルの厚さ、アガロース濃度、検出されるフラグメントサイズによって異なります。ゲルが厚く、アガロース濃度が高ければ、染色時間も長くなります。
8. ゲルを染色溶液から取り出し、300 nm UVトランスイルミネーター、CCDカメラまたはDark Reader®トランスイルミネーター (Clare Chemical Research, Inc.) で観察します。GelStar® および SYBR® Greenで染色されたゲルは脱染不要です。染料による蛍光発色は、溶液中よりもDNAと結合した場合のほうがより強くなります。

## アガロースゲルでGelStar®染色を使用する場合の手順

1. GelStar®染色の濃縮ストック溶液を冷凍庫から取り出し、融解します。
2. 微小遠心分離用チューブで溶液を遠心分離します。
3. アガロース溶液を調製します (406-408ページ参照)。
4. アガロース溶液が70℃まで冷えたら、濃縮ストック溶液をゲル溶液で1:10,000に希釈し、ゲルに流し入れて染料を追加します (1 µl / 10 ml)。
5. 溶液をゆっくりと渦動させます。
6. ゲルをキャストインゴートレイに流し入れます (409ページ参照)。
7. DNAをウェルに入れます。
8. ゲルを電気泳動させます。
9. 電気泳動チャンバーからゲルを取り出します。
10. 300 nm UVトランスイルミネーター、CCDカメラまたはDark Reader®トランスイルミネーター (Clare Chemical Research, Inc.) で観察します。GelStar®は脱染不要です。染料による蛍光発色は、溶液中よりもDNAと結合した場合のほうがより強くなります。

## GelStar®およびSYBR® Green染色を用いた垂直ゲル染色

GelStar®およびSYBR® Green染色を組み合わせるゲルに使用したり、使用するDNAを垂直のまま事前に染色したりすることは推奨されません。ガラスまたはプラスチックのプレートやDNAに結合する染料は、ほとんどまたは全くシグナルを示さない場合があります。ゲルは、前のセクションで説明したように、後で染色してください。

GelStar®またはSYBR® Green染色で垂直ゲルを染色する場合は、本手順に従ってください。上記の手順1~4に従います。

5. カセットを開封してゲルをプレート上に配置します。
6. 側面を持ち上げながらプレートとゲルを染色容器に配置します。
7. ゲル表面に染料を静かに流し入れます。
8. 5~15分間ゲルを染色します。
9. 300 nm UVトランスイルミネーター、CCDカメラまたはDark Reader®トランスイルミネーター (Clare Chemical Research, Inc.) で観察します。GelStar®およびSYBR® Green染色ゲルは脱染不要です。染料による蛍光発色は、溶液中よりもDNAと結合した場合のほうが強くなります。

## GelStar®, SYBR® Green I, II核酸ゲル染色によるDNAの検出

続き

## 写真による可視化

少量のDNAを検出する場合、GelStar®およびSYBR® Green染色で染色されるゲルが示すバックグラウンド蛍光はわずかであり、これによって長時間の撮影用曝露が可能となります。染色用の適切な撮影用フィルターを使用してください。

推奨撮影タイプと撮影条件：

Polaroid® Film	f-stop	Exposure Time
Type 57 or 667	4.5	0.5 – 2 seconds
Type 55	4.5	15 – 45 seconds

## 画像取り込みシステムによる可視化

最善の結果と最適な感度を得るには、Dark Reader®トランスイルミネーター (Clare Chemical Research, Inc.) 上でGelStar®で染色したゲルを可視化します。GelStar®およびSYBR® Green染色はほとんどのCCDおよび動画イメージングシステムに対応しています。実際に使用するシステムのフィルターの種類によっては、新しいフィルターを購入する必要があります。必要なフィルターについては、システムのメーカーに問い合わせてください。

Stain	Emission (nm)	Excitation (nm)
GelStar®染色	527	493
SYBR® Green I染色	521	494
SYBR® Green II染色	513	497

## 適用上の注意

- GelStar®およびSYBR® Green染色は、これらの蛍光特性によりアルゴンイオンレーザーに対応しています。
- これらの染色剤は核酸のエタノール沈殿の標準プロトコルによって二本鎖DNAから除去できます。
- エチジウムブロマイドであらかじめ染色されたゲルは、後染色の標準プロトコルに従って、泳動後にGelStar®またはSYBR® Green染色で染色できます。
- 塩化セシウム密度勾配プラスミドの調製にGelStar®およびSYBR® Green染色を使用することは推奨されません。DNAの浮遊密度への染色液の効果が不明です。
- これらの染色は酵素反応に干渉しません。
- これらの染料で染色されたゲルにサザンプロット法を適用する場合は、プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションにおいて0.1%~0.3%のSDSを添加するよう推奨されます。
- 二本鎖DNA結合GelStar®またはSYBR® Green染色はUV透照下で緑蛍光を発色します。一本鎖領域をもつDNAを含むゲルは緑ではなく橙色を発する可能性があります。

## 汚染除去

染色溶液は、活性炭でろ過してから廃棄し活性炭は焼却してください。活性炭による吸収については、Sambrook *et. al.*, pp. 6.16 – 6.19 (1989年) を参照してください。核酸染色溶液の汚染除去と処理については、国と地方公共団体のガイドラインに従ってください。