Lonza

電気泳動・分析

FAQ

電気泳動とアガロース

Q.　アガロース電気泳動では、どのような緩衝液条件で最良の分解能を得ることができますか？

A.　回収の必要がない小さなDNA断片（<1,000 bp）では、1X TBE緩衝液の使用が推奨されます。ゲルをTBE緩衝液で作成すると、TAE緩衝液で作成したゲルよりも鮮明なバンドが得られます。TBEはより良い分解能をもたらし、間隔が狭く鮮明なDNAバンドの形成を可能にします。

大きなDNA断片（>15,000 bp）では、1X TAE緩衝液の使用が推奨されます。TAEの緩衝能力はTBEよりも低いため、長時間電気泳動を行う場合には、緩衝液を再循環させるか、定期的に陽極チャンバーと陰極チャンバーの間で緩衝液を攪拌する必要があるかもしれません。緩衝液不足となる時間は、ボルト/時間や使用されるチャンバーの大きさによって異なります。ゲル上での緩衝液の深さは3～5 mmにしてください。緩衝液が少なすぎると、ゲルが乾燥する可能性があります。緩衝液が多すぎると、陽極と陰極間の回路抵抗が低下し、ゲル全体の電圧勾配が低下します。これによってDNAの動きが不十分となり、余分な発熱やバンドの変形が生じる恐れがあります。

Q.　最良の分解能を得るにはゲルをどのようにキャストすべきですか？

A.　ロンザでは、通常ゲルを3～4 mmの厚さでキャストします。必要となるゲル量は、キャスティングチャンバーの底面積を測定し、ゲルの厚さで乗じることによって簡単に見積もることができます。薄いゲルは、GelBond®サポートフィルムおよび/または垂直装置に使用できます。

電界側のコームの厚さも、分解能に大きな影響を与えます。薄いコーム（1 mm）はDNAバンドの幅を狭めます。コームが厚過ぎると、分離したDNAバンドはかなり幅広くなります。

Q.　DNAのバンドが時々波状になります。しかしそのようになるのは1つまたは2つのレーンのみです。この原因は何ですか？

A.　コームの歯に付着した乾燥したアガロースが、原因になることがあります。ゲルを作る前に、コームの歯についた残余乾燥アガロースを確認してください。取り除かないと、これが新規に作成されたアガロースと付着してコームを取り除く際にウェルを壊します。これはゲルがトランスイルミネーター上になければ通常観察されません。さらに、低温融解アガロースを使う場合、コームをはずすときは特に細心の注意を払う必要があります。ゲルをあらかじめ4℃で30分間冷却する、および/またはコームをはずす前にゲルを冷たい緩衝液で洗浄することによって、ゲルを維持することができます。

Q.　ウェルあたりのDNA量はどのくらいですか？

A.　ウェルあたりのDNA量は状況によってさまざまです。最も重要なことは、分解したいバンドにDNAがどれだけ存在するかということです。エチジウムブロマイドで安定的に検出される最小DNA量は、約10 ngです。エチジウムブロマイドで染色したゲル上で鮮明なバンドとして検出できるDNA量は約 100 ng です。GelStar®染色などのさらに高感度の染色法を用いると、染色されるゲル上のDNA量は少なくてすみます。GelStar®で染色したゲルでは、わずか 20 pg の dsDNA を検出できます。ウェル上への最適なDNA量は、目的のバンドに存在する総DNA量比によって計算されます。DNAの出現量が定かでない場合は、可能であればいくつかのレーンにさまざまな量を使用してください。

ウェル上のDNAの最適量は、目的のバンドに存在する総DNA量の比率から計算できます。計算方法は以下のようになります。

$$\frac{\text{目的の断片 (kbp)}}{\text{DNAサンプルのサイズ (kbp)}} \times 100 = \text{\% 目的のバンド中のDNA}$$

注記：鮮明なバンドを形成する最大DNA量は約100 ngです。

例：DNAサンプルサイズは48.5 kbpでゲル上で泳動させると、8断片に分離します。目的の断片は2.3kbpです。

計算方法：1 μgのDNAを使用する場合、使用されたサンプル1 μgの4.7%が目的の断片として示されます（47 ng）。

$$\frac{2.3\ \text{kbp}}{48.5\ \text{kbp}} \times 100 = 4.7\%\ \text{目的のバンド中のDNA}$$

バンドをさらに鮮明にするには、スクロースまたはグリセロールベースのローディングバッファーの代わりに、ロンザDNAローディングバッファー（カタログNo.50655）などのFicoll®ベースのローディングバッファーをご使用ください。低分子量のグリセロールを使用することによって電気泳動のU字型のバンドが生じないようDNAがウェルの側面に並ぶようにします。

イオン強度が高すぎるローディングバッファーは、バンドを不鮮明にする原因となる可能性があります。理想的には、DNAサンプルには泳動緩衝液と同じ溶液を使用するべきです。これが不可能な場合は、泳動緩衝液よりも弱いイオン強度をもつサンプル緩衝液を使用してください。

FAQ
続き

Q. アガロースゲルにどの程度の電圧をかけるべきですか？

A. 通常の水平電気泳動では、4～10ボルト/cmでアガロースゲルに電圧をかけるよう推奨されます（cmはゲル長ではなく電極距離を測定することによって決定します）。電圧が高すぎる場合、特にDNA >15 kbを使用する場合はバンドの線が生じる可能性があります。電圧が低すぎると、小型（<1,000 bp）DNAの泳動性が弱まり、拡散によってバンド幅が拡大します。

MetaPhor™アガロースゲルは、標準水平電気泳動システムにおいて、4.5～5ボルト/cmでDNAを最適に分離します。電圧が高すぎると、主にゲルの過熱によりDNAの分解能が弱まります。もう1つの特殊なケースとして、通常の水平電気泳動を用いた大型（>15 kb）DNA断片の分離があります。この場合の最良の分離は<5ボルト/cmの電圧勾配で得られます。

Q. NuSieve™3:1とNuSieve™ GTG™アガロースの違いは何ですか？

A. NuSieve™3:1アガロースは、標準融点アガロースです。NuSieve™3:1アガロースの分解範囲は50bp～1000 bp です。NuSieve™ 3:1 アガロースは、分析用電気泳動向けに設計されています。ゲル強度が高いため、様々なブロッティングに最適な製品となっています。NuSieve™ GTG™アガロースは低温融解アガロースです（4%で≤65℃）。このアガロースの分解範囲は50 bp～1000 bpです。NuSieve™ GTG™アガロースは、クローニング、連結、形質転換などへの使用が推奨されます。

Q. GTG™アガロースとは何ですか？

A. GTG™は、Genetic Technology Grade™の略です。GTG™等級アガロースは、予備的なDNA電気泳動または酵素によるDNA操作が必要な場合に推奨されます。これらのアガロースは、標準的な分子生物学の実験に最大限対応できるように試験されています。

プレキャストアガロースゲル

Q. Reliant™および Latitude™プレキャストゲルを使用するために専用のチャンバーを購入する必要がありますか？

A. Reliant™および Latitude™プレキャストアガロースゲルは、標準水平電気泳動チャンバーで使用するよう設計されています。ゲル用チャンバープラットフォームに設置可能であれば使用に適しています。チャンバープラットフォームを測定し、対応するプレキャストゲルのサイズを確認してください。例えば、OWL® Centipede™ チャンバーは、14 cm × 24 cm Latitude™HT プレキャストゲルに最適です。一方、OWL®B1EasyCast™ チャンバーは、Reliant™プレキャストアガロースゲルに適しています。またLatitude™チャンバーは、Latitude™ミディゲルに最適です。結果はチャンバーの大きさや構造によって変化することがあります。

Q. FlashGel™カセットの成分は有害ですか？

A. FlashGel™カセットに含まれる染色液は、OSHAおよびEU危険物基準では、含有分程度の少量であれば有害とみなされていません。MSDSをオンラインで入手できます。カセット内の染色液は突然変異誘発物質となる可能性があります。取り扱い時は、手袋、安全眼鏡、研究用作業服を着用してください。カセットの取り扱いと処理を行う際は、エチジウムブロマイドで染色したゲルと同じ取り扱いおよび廃棄時の注意に従ってください。

FAQ
続き

PAGEr™プレキャストゲル

Q. 所有しているゲルチャンバーに適しているのは、どのPAGEr™プレキャストゲルですか？

A. PAGEr™プレキャストゲルは、9 cm × 10 cm および10 cm × 10 cm のサイズで販売されており、ほとんどのミニ垂直システムに適しています。チャンバーによっては、PAGEr™プレキャストゲルに最適となるように調整を行う必要があります。

Standard Vertical Systems	PAGEr™ ゲル
PAGEr™ Minigel Chamber	9 cm × 10 cm 10 cm × 10 cm*
Bio-Rad® MiniPROTEAN® II, MiniPROTEAN® 3, Mini-PROTEAN® Tetra, Mini-PROTEAN® Dodeca™ and Ready Gel® Cell Systems Reverse the inner core gasket so the flat side faces outward.	9 cm × 10 cm
Novex® XCell SureLock® Mini-Cell or XCell II Request the spacer for the XCell SureLock®, Mini-Cell Chamber from Scientific Support, (Cat. No. 59900).	9 cm × 10 cm 10 cm × 10 cm*
FisherBiotech® Vertical Minigel FBVE121, Owl Separations Systems Wolverine™ P82 Chamber comes with 2 sets of wedges. Use the thinner wedges for the PAGEr™ Gold ゲル.	10 cm × 10 cm
FisherBiotech® Vertical Minigel FB-VE101, Owl Separations Systems Penguin™ Model P8DS Request adaptor for these chambers from Scientific Support, (Cat. No. 59902).	10 cm × 10 cm
Hoefer® Mighty Small™ (SE250) Replace the buffer chamber with a 'Deep lower buffer chamber for the SE260', order number 80-6148-78, from GE Healthcare.	9 cm × 10 cm 10 cm × 10 cm*
Daiichi 2, ISS chambers To run one gel: Place one 10 × 10 cm cassette on wedge side of chamber. Use suitable buffer dam on the other side. Use regular Daiichi/ISS wedges. To run two gels: Widen the hole on the yellow port of the inner core. Replace the long arm wedges with modified wedges. This chamber modification and new wedges are available from Scientific Support.	10 cm × 10 cm
Hoefer® Mighty Small™ (SE260)	9 cm × 10 cm 10 cm × 10 cm
EC 120 Mini Vertical Gel System	9 cm × 10 cm 10 cm × 10 cm
Biometra® Mini V Chamber	9 cm × 10 cm
CBS Scientific MGV System, (10 cm × 8 cm units)	9 cm × 10 cm
Sigma-Aldrich Mini Techware (11.3 cm × 10 cm units)	10 cm × 10 cm
Zaxis System 2000	10 cm × 10 cm
Hoefer® Mini VE	10 cm × 10 cm

*Recommended for best fit.

Q. ロンザ PAGEr™プレキャストゲルには濃縮用ゲルが含まれますか？ 濃縮用ゲルの目的は何ですか？

A. PAGEr™Goldプレキャストゲルには、pH 8.6の4%濃縮用ゲルが含まれています。濃縮用ゲルを使用すると、ゲル濃縮/分解境界において、タンパク質が凝集して濃縮（つまり堆積）されます。この濃縮効果により、よりよい分解能が得られます。

Q. 非変性ゲルを使いたいと考えています。どの製品がこれに該当しますか？

A. PAGEr™プレキャストゲルは、SDSまたはその他の変性物質（例：DTTやb-ME）を含みません。さらに、SDSを含まないトリス-グリシン泳動緩衝液を使うこともできます。

FAQ
続き

タンパク質電気泳動

Q. トランスファー, 泳動, サンプル緩衝液の組成は？

A. トリス–グリシンゲル（Tris-HCl緩衝液システム）

Towbin transfer buffer (1X)	Running buffer (1X)	Sample buffer (1X)
0.025 M Tris base	25 mM Tris Base	62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8
0.192 M Glycine	192 mM Glycine	2% SDS*
0.05 – 0.1% SDS*	0.1% SDS*	10% Glycerol
20% Methanol		0.01% Bromophenol Blue
		2.5% bME (2-mercaptoethanol)*

*Omit for native proteins.
For best results use Lonza AccuGENE™ Electrophoresis Buffers

Q. グラディエントvs.均一（単一濃度）ゲルの違いは何ですか？どちらを使用すべきですか？

A. グラディエントゲルは、幅広いサイズの分解に適しています。均一または単一濃度ゲルは、目的のタンパク質が狭いサイズ範囲に収まることがわかっている場合に適しています。

Q. ゲルに載せるタンパク質量はどれくらいですか？

A. タンパク質量は、サンプルの純度や使用される染色方法によって異なります。高純度のタンパク質では、ミニゲルのレーン毎に、0.5 μg～5 μgのタンパク質で通常は十分です。溶解した細胞のような混合物には、レーン毎に 50 μg のタンパク質が必要となる場合があります。

タンパク質の染色液ごとの検出限界

Protein stain	Lower detection limit (protein/band)
Coomassie® Blue Stain	30 ng
Silver Stain	2 ng
SYPRO® Red Protein Gel Stain	4 ng – 8 ng
SYPRO® Ruby Protein Gel Stain	2 ng – 8 ng
SYPRO® Tangerine Protein Gel Stain	4 ng – 8 ng
ProSieve™ EXSafe Stain	8 ng – 15 ng

NOTE: Limits are based on optimal detection methods for each stain.

Q. ウェスタンブロッティングに最良なメンブレンは何ですか？

A. 最良なメンブレンは以下の表を参照してください。

Nitrocellulose	PVDF	Nylon
Hydrophobic binding	Hydrophobic binding	Hydrophobic and electrostatic binding
General purpose membrane	SDS tolerant	Stable if baked
Low background	High background	High background
Low strength	High strength	High strength
Becomes brittle if baked	Suitable for protein sequencing	Least suitable for Western transfer

Q. タンパク質のゲル電気泳動にアガロースを使用する利点とは何ですか？

A. アガロースゲルを用いたタンパク質の電気泳動は、ポリアクリルアミドの代替手段であり、いくつかの利点があります。

- 高分子量（>600 kDa）のタンパク質を分離
- 調製や取り扱いが簡単
- タンパク質の回収が効率的
- 使用されるタンパク質を免疫動物に直接使用して抗原産生を行える
- 毒性無し
- 垂直または水平装置を用いたゲルの利用