

アガロースゲルの調製

アガロース濃度と染料の移動度

表1：特定用途のためのアガロース

Size Range (base pairs)	Agarose Type	Application
20 – 800	MetaPhor™ Agarose	High resolution analysis; 2% size differences
50 – 1,000	NuSieve™ 3:1 Agarose	Analysis and blotting; 4% – 6% size differences resolved
	NuSieve™ GTG™ Agarose	Analysis and blotting; In-gel; 6% size differences resolved
1,000 – 10,000	SeaKem® GTG™ Agarose	Analysis and blotting; recovery required
	SeaPlaque™ GTG™ Agarose	In-gel
10,000	SeaKem® Gold Agarose	Analysis

表3：DNA サイズに対するアガロース濃度

Size range (base pairs)	Final Agarose Concentration % (w/v)	
	1X TAE buffer	1X TBE buffer
SeaKem® LE and SeaKem® GTG™ Agarose		
1,000 – 23,000	0.60	0.50
800 – 10,000	0.80	0.70
400 – 8,000	1.00	0.85
300 – 7,000	1.20	1.00
200 – 4,000	1.50	1.25
100 – 3,000	2.00	1.75
NuSieve™ 3:1 Agarose		
500 – 1,000	3.0	2.0
100 – 500	4.0	3.0
10 – 100	6.0	5.0
MetaPhor™ Agarose		
150 – 800	2.0	1.8
100 – 600	3.0	2.0
50 – 250	4.0	3.0
20 – 130	5.0	4.0
<80	—	5.0
SeaPlaque™ and SeaPlaque™ GTG™ Agarose		
500 – 25,000	0.75	0.70
300 – 20,000	1.00	0.85
200 – 12,000	1.25	1.00
150 – 6,000	1.50	1.25
100 – 3,000	1.75	1.50
50 – 2,000	2.00	1.75
NuSieve™ GTG™ Agarose		
500 – 1,000	2.5	2.0
150 – 700	3.0	2.5
100 – 450	3.5	3.0
70 – 300	4.0	3.5
10 – 100	4.5	4.0
8 – 50	5.0	4.5
SeaKem® Gold Agarose †		
5,000 – 50,000	0.3	—
1,000 – 20,000	0.5	—
800 – 10,000	0.8	—
400 – 8,000	1.0	—

† TBE buffer is not recommended for separation of DNA >12,000 bp.

表2：TAE と TBE 緩衝液システムの特性

Buffer	Suggested Uses and Comments
TAE buffer	Use when DNA is to be recovered Use for electrophoresis of large (>12 kb) DNA Low ionic strength Low buffering capacity — recirculation may be necessary for extended electrophoretic times
TBE buffer	Use for electrophoresis of small (<1 kb) DNA Decreased DNA mobility High ionic strength High buffering capacity — no recirculation required for extended run times

表4：アガロースゲルにおけるプロモフェノールブルー (BPB) とキシレンシアノール (XC) と二本鎖DNAの移動度の関係

	1X TAE Buffer		% Agarose	1X TBE Buffer	
	XC	BPB		XC	BPB
SeaKem® LE and SeaKem® GTG™ Agarose					
	24,800	2,900	0.30	19,400	2,850
	16,000	1,650	0.50	12,000	1,350
	10,200	1,000	0.75	9,200	720
	6,100	500	1.00	4,100	400
	3,560	370	1.25	2,500	260
	2,800	300	1.50	1,800	200
	1,800	200	1.75	1,100	110
	1,300	150	2.00	850	70
NuSieve™ 3:1 Agarose					
	950	130	2.50	700	70
	650	80	3.00	500	40
	350	40	4.00	250	20
	200	30	5.00	140	8
	120	20	6.00	90	4
MetaPhor™ Agarose					
	480	70	2.00	310	40
	200	40	3.00	140	35
	120	35	4.00	85	30
	85	30	5.00	60	15
SeaPlaque™ and SeaPlaque™ GTG™ Agarose					
	11,700	1,020	0.50	6,100	400
	4,000	500	0.75	2,850	280
	2,300	350	1.00	1,700	180
	1,500	200	1.25	1,000	100
	1,000	150	1.50	700	70
	700	100	1.75	500	50
	550	60	2.00	400	30
	320	30	2.50	250	10
NuSieve™ GTG™ Agarose					
	750	175	2.50	460	75
	400	120	3.00	210	35
	115	<20	4.00	150	<20
	100	<20	5.00	80	<20
	85	<20	6.00	50	<20
SeaKem® Gold Agarose					
	24,800	3,550	0.30	19,000	2,550
	12,200	2,050	0.50	9,200	1,500
	9,200	1,050	0.75	7,100	800
	6,100	760	1.00	4,000	500
	4,100	600	1.25	2,550	350
	2,600	400	1.50	1,900	250
	2,000	330	1.75	1,400	180
	1,500	250	2.00	1,000	100

アガロースゲルの調製

続き

分析用アガロース仕様

	Agarose	Melting Temperature	Gel Strength g/cm ²	Gelling Temperature	EEO [-mr]	Moisture	Sulfate
DNA <1 kb	NuSieve™ 3:1	≤90°C at 4%	≥1,400 at 4%	32.5°C – 38°C at 4%	≤0.13	≤10%	≤0.15%
	MetaPhor™	≤75°C at 3%	≥300 at 3%	≤35°C at 3%	≤0.05	≤10%	NA
	NuSieve™ GTG™	≤65°C at 4%	≥500 at 4%	≤35°C at 4%	≤0.15	≤10%	≤0.15%
DNA >1 kb	SeaKem® LE	NA	≥1,200 at 1%	36°C ± 1.5°C at 1.5%	0.09 – 0.13	≤10%	≤0.15%
	SeaKem® GTG™	NA	≥1,200 at 1%	36°C ± 1.5°C at 1.5%	0.09 – 0.13	≤10%	≤0.15%
	SeaPlaque™	≤65°C at 1.5%	≥200 at 1%	26°C – 30°C at 1.5%	≤0.10	≤10%	≤0.10%
	SeaPlaque™ GTG™	≤65°C at 1.5%	≥200 at 1%	26°C – 30°C at 1.5%	≤0.10	≤10%	≤0.10%
PFGE	SeaKem® Gold	NA	≥1,800 at 1% ≥3,500 at 1.5%	34.5°C – 37.5°C at 1.5%	≤0.05	≤10%	≤0.10%
	InCert™	≤70°C at 1.5%	≥350 at 1%	26°C – 30°C at 1.5%	≤0.10	≤10%	≤0.15%
Identity testing	I.D.NA™	NA	≥1,300 at 1%	36°C ± 1.5°C at 1.5%	≤0.10	≤10%	≤0.15%
Protein electrophoresis	SeaKem® ME	NA	≥1,000 at 1%	36°C ± 1.5°C at 1.5%	0.16 – 0.19	≤10%	≤0.20%
	SeaKem® HE	NA	≥650 at 1%	36°C ± 1.5°C at 1.5%	0.23 – 0.26	≤10%	≤0.20%
	SeaKem® HEE0	NA	≥650 at 1%	36°C ± 1.5°C at 1.5%	≥0.30	≤10%	≤0.25%
	SeaKem® HGT	NA	≥800 at 1%	42°C ± 1.5°C at 1.5%	≤0.10	≤10%	≤0.30%
von Willenbrand's Factor Separation	SeaKem® HGT[P]	NA	≥1,000 at 1%	42°C ± 1.5°C at 1.5%	≤0.10	≤10%	≤0.20%
Isoelectric focusing	IsoGel™	NA	≥500 at 1.5%	35°C – 45°C	Not Detectable	≤10%	≤0.20%
Cell culture	SeaPrep™	≤50°C at 1%	≥75 at 2%	8°C – 17°C at 0.8%	≤0.05	≤10%	≤0.10%

アガロースゲルの調製

続き Dissolving Agarose

アガロースは分散、水和、融解/分解を経て溶解されます。

ゲル濃度<2% w/v用電子レンジ使用手順

1. 溶液の2~4倍の容積のビーカーを選択します。
2. 室温の1Xまたは0.5X緩衝液とスターラーバーをビーカーに入れます。
3. 溶液をすばやくかき混ぜながら計量したアガロース粉末を加えます。
4. Teflon®加工されていないスターラーバーは取り除きます。
5. 加熱前にビーカーと溶液の重さを測ります。
6. ビーカーにプラスチックの蓋をします。
7. プラスチックの蓋に小さな穴をあけて通気口を作ります。
8. 泡が発生するまで、ビーカーを電子レンジの「高」出力で加熱します。

⚠ 注意：電子レンジにかけた溶液は過度な加熱により攪拌時に泡が飛び出すおそれがあります。

9. 電子レンジからビーカーを取り出します。
10. ビーカーを静かに渦動させ、沈殿している粉末やゲル片を再懸濁します。
11. 溶液が沸騰するまで、ビーカーを電子レンジの「高」出力で再加熱します。
12. 1分間、またはすべての粒子が溶解するまで沸点を保ちます。
13. ビーカーを電子レンジから取り出します。

⚠ 注意：容器が熱く火傷をするおそれがあるため、ビーカーを電子レンジから取り出す際は鍋つかみを使用してください。

14. アガロース溶液が完全に混ざるまで、ビーカーを静かに渦動させます。
15. 溶解後、十分に熱した蒸留水を追加して初期重量を測ります。
16. 十分に混合します。
17. キャスティング前に60℃まで溶液を冷やします。

■ 材料

- 電子レンジもしくはホットプレート
- 溶液の2 - 4倍量のビーカー
- Teflon®コート済みのスターラーバー
- スターラー
- プラスチックラップ
- オープン用手袋もしくは手保護用のグローブ

■ 試薬

- 蒸留水
- アガロース粉末

⚠ 注意：常に保護眼鏡を着用し、作業者本人とその周りの人を溶液による火傷から守ってください。

アガロースゲルの調製

続き

ゲル濃度 $\geq 2\%$ w/vでの電子レンジ使用手順

1. 溶液の2~4倍の容積のビーカーを選択します。
2. 室温、または冷やした緩衝液（MetaPhor™およびNuSieve™ GTG™ アガロース用）とスターラーバーをビーカーに追加します。
3. ダマができないように溶液をすばやくかき混ぜながら、あらかじめ計量したアガロース粉末を加えます。
4. Teflon®加工されていないスターラーバーは取り除きます。
5. 加熱前に15分間緩衝液にアガロースを浸します。これによって加熱中にアガロース溶液から泡が形成されにくくなります。
6. 加熱前にビーカーと溶液を計量します。
7. ビーカーにプラスチックの蓋をします。
8. プラスチックの蓋に小さな穴をあけて通気口とします。アガロース濃度 $>4\%$ の場合は、以下の追加手順によって、融解/溶解中のアガロース溶液の泡の形成をさらに抑制できます。
 - a. ビーカーを電子レンジの「中」出力で1分間加熱します。
 - b. 電子レンジから溶液を取り出します。
 - c. 溶液を実験台で15分間静置します。
9. ビーカーを電子レンジの「中」出力で2分間加熱します。

⚠ 注意：電子レンジにかけた溶液は過度な加熱により攪拌時に泡が飛び出すおそれがあります。

10. ビーカーを電子レンジから取り出します。

⚠ 注意：容器が熱く火傷をするおそれがあるためビーカーを電子レンジから取り出す際は鍋つかみを使用してください。

11. ビーカーを静かに渦動させ、沈殿している粉末やゲル片を再懸濁します。
12. 「高」出力で1~2分間または溶液が沸騰するまでビーカーを再加熱します。
13. 1分間またはすべての粒子が溶解するまで沸点を保ちます。

14. ビーカーを電子レンジから取り出します。
15. アガロース溶液が完全に混ざるまで静かに攪拌します。
16. 溶解後、十分に熱した蒸留水を追加して初期重量を測ります。
17. よく攪拌します。
18. キャスティング前に60℃まで溶液を冷やします。

ホットプレート使用によるアガロース調製手順

1. 溶液の2~4倍の容積のビーカーを選択します。
2. 室温または冷やした緩衝液（MetaPhor™およびNuSieve™ GTG™ アガロース用）とスターラーバーをビーカーに追加します。
3. ダマができないように溶液をすばやくかき混ぜながら、あらかじめ計量したアガロース粉末を加えます。
4. 加熱前にビーカーと溶液の重量を測定します。
5. ビーカーにプラスチックの蓋をします。
6. プラスチックの蓋に小さな穴をあけて通気口とします。
7. 攪拌しながら溶液を沸騰させます。
8. アガロースが溶解するまで（約5~10分間）静かに沸騰させ続けます。
9. 十分に加熱した蒸留水を加えて初期重量になるまで補充します。
10. 十分に混合します。
11. キャスティング前に60℃まで溶液を冷やします。

⚠ 注意：常に保護眼鏡を着用し、作業者本人とその周りの人を溶液による火傷から守ってください。

アガロースゲルの調製

続き

水平ゲルキャスト手順

1. アガロース溶液を60℃まで冷やします。
2. アガロース溶液を冷やしている間に以下を行います。
 - a. ゲルキャストトレイを組み立てます。
 - b. アガロース溶液を流し入れる前にキャストトレイを水平にします。
 - c. 残余乾燥アガロースが付着していないかどうか、コームの歯を確認します。熱い蒸留水に浸したティッシュを使って、コームの歯をこすることにより乾燥アガロースを除去できます。
 - d. コームの歯の下端とキャストトレイの間に小さな隙間（約0.5 mm～1 mm）をつくります。
3. アガロース溶液をゲルトレイに流し入れます。
4. コームの位置を元に戻します。
5. 室温で30分間、アガロースをゲル化します。
6. 低温融解アガロースおよびMetaPhor™アガロースでは、さらに4℃で30分間ゲル化する必要があります。この作業を加えることによって扱いやすいゲルになります。MetaPhor™アガロースで良好な分解能を得るにはこの追加の冷却手順が不可欠です。
7. ゲルが用意できたら泳動緩衝液を満たします。
8. コームをゆっくりと取り外します。
9. ゲルキャストトレイを電気泳動チャンバーに配置します。
10. 緩衝液を流し入れ、ゲル表面上で3 mm～5 mmに達するまでチャンバーを満たします。
11. パスツールピペットを使って、電気泳動緩衝液でウェルを静かに洗い流し、サンプルを載せる前にはがれかかっているゲル断片を取り除くようにします。
12. DNAを載せて電気泳動を開始します。

電界側のコームの厚さが、分解能に影響する可能性があります。薄いコーム（1 mm）によって明瞭なDNAバンドが得られます。厚いコームを使用すれば、ウェルにさらに多くの分量を追加できますが、分離するDNAバンド幅が広がる可能性があります。

■ 材料

- 水平泳動システム
- コーム
- パスツールピペット

■ 試薬

- アガロース溶液
- 泳動緩衝液

電圧表

DNA電気泳動に最適な電圧のクイックリファレンスを表に示します。

DNAのサイズとアプリケーションに適した推奨電圧と緩衝液

サイズ	電圧	— 緩衝液 —	
		回収用	分析用
≤1 kb	5 V/cm	TAE	TBE
1 kb to 12 kb	4 – 10 V/cm	TAE	TAE/TBE
>12 kb	1 – 2 V/cm	TAE	TAE

最適な電気泳動時間

ゲルは、目的のバンドがゲル長の40%～60%移動するまで電気泳動します（「染色液移動表」参照）。分散や拡散によって生じるバンドの広がりによって、ゲルの3分の1以下の部分の分解が悪くなります。またゲルが小さくなれば、分解能も低下する可能性があります。これは電気泳動が長引くほど、2つの断片間に大きな隔たりが生じるからです。