

アガロースゲルからのDNAの回収

アガロースゲルからDNAの回収効率を上げるためのヒント

本セクションでは、あらゆる回収方法の中でもアガロースゲルからDNAの回収効率を高めるさまざまなヒントを紹介いたします。

回収のための適切なアガロースの選択

DNAを回収する場合、アガロースの選択は最も重要な要素の1つです。不純物が混在した回収を避けるため、ゲル内反応を選択することができます。

ロンザは、分子生物学研究用途に特別に調製されたGenetic Technology Grade™ (GTG™) 製品を提供しています。257 ~ 259ページを参照してください（ロンザのアガロースに適した回収方法については以下の表を参照してください）。

緩衝液の種類

アガロースゲルからDNAを回収する場合、電気泳動用1X TAE緩衝液の使用が推奨されます。

キャストリングとDNA充填のヒント

- 1X TAE緩衝液内でゲルを準備します。
- エチジウムブロマイドとゲルと一緒にキャストしないでください。
- ゲルを3~4 mmの厚さでキャストします。
- ≤1 mmの厚さのコームを使用します。
- DNAの量は1バンドにつき 100 ng 以下となるようにします。

染色と回収のヒント

アガロースゲルからDNAを回収する場合の推奨項目は以下の通りです。

- ゲルを15~20分間染色します。
- 蒸留水で2回、20分間ずつ洗浄してゲルを脱染します。
- DNAを紫外線で1分以上照射しないでください。紫外線にDNAを長時間曝露するとDNAが損傷するおそれがあります。
- 紫外線が誘発する損傷からDNAを守るには、1 mMのグアノシンとシチジンをゲルと電気泳動緩衝液に添加することが効果的です。
- 可能な限り小さなゲル片を切り出します。

分子量マーカーのすぐ隣に少量のサンプル流して、別のレーンで電気泳動を行うことにより回収に使用されるサンプルの染色を避けることができます。ただし、エチジウムブロマイドを欠くため、DNAが紫外線による損傷をうけます。そのため紫外線への曝露時間は可能な限り短くしてください。少量のマーカーおよびサンプルを含むレーンをゲルと染料の残りから切り出します。予備の分を回収するには、染色されたゲルポーションを染色されていないポーションと並べます。UVトランスイルミネーターで確認しながら、染色されていないゲルのポーション上にあるサンプルと並ぶ領域を切り出します。FlashGel™回収システム（270ページ）を使えば、紫外線を使わずにDNA回収することができます。

参考文献

Grundemann, D. and Schomig, E., *BioTechniques* 21(5): 898 – 903, 1996.

ロンザのアガロースにおける回収方法

	In-Gel	β -Agarase	Phenol/ Chloroform	Recovery Columns	Electroelution	Freeze/ Squeeze
SeaKem® GTG™アガロース			■	■	■	■
SeaPlaque™ GTG™アガロース	■	■	■	■	■	■
NuSieve™ GTG™アガロース	■	■	■	■	■	■
MetaPhor™アガロース			■	■	■	■
SeaPlaque™アガロース		■	■	■	■	■

アガロースゲルからのDNAの回収

続き

アガロースゲルからDNAのフェノール/クロロフォルム抽出物

適合性のあるアガロース

- SeaPlaque™ GTG™ アガロース
(DNA回収について認証と試験済み)
- NuSieve™ GTG™ アガロース
(DNA回収について認証と試験済み)
- SeaPlaque™ アガロース

ヒント

フェノール/クロロフォルムを使用してアガロースからDNA抽出をする場合、多くのケースで抽出するアガロース片が大きすぎるか、エタノール沈殿手順でDNAと共にアガロースが沈殿することで回収に失敗します。この問題を回避するために以下の事項が推奨されます。

- 1本の試験管に抽出するアガロースの量は200 mg (200 µl) 以下にします。DNAを含むゲル片がこれより大きい場合、小さく分割してからエタノール沈殿の前に抽出した溶液に加えてください。
- アガロースのエタノール沈殿は以下の手順で避けることができます。まず抽出された溶液を氷上で15分間冷やしてから、低温室で微小遠心分離機を使い、最高速度で15分間サンプルを遠心分離します。その後塩とエタノールを加えます。上清は慎重に別容器に移します。上清のDNAは、以下の標準プロトコルに従って沈殿させます。
- サイズの大きなDNA (>10kb) では使えません。攪拌するとDNAが切断されます。

アガロースゲルから回収されるDNAのエタノール沈殿

ヒント

- 塩とエタノールを加える前に、以下の手順を行うことでアガロースの沈殿を避けることができます。まず氷上で上清を15分間冷やします。次に低温室で微小遠心分離機を使い、最高速度で15分間サンプルを遠心分離します。上清は慎重に別容器に移します。上清のDNAは以下の標準プロトコルに従ってエタノール沈殿させます。
- アガロースオリゴ糖がDNAまたはRNAと共に沈殿する可能性を避けるため、エタノール沈殿は酢酸ナトリウムではなく酢酸アンモニウムを用いて室温でインキュベートします。