

ViewaBlue® Stain KANTO染色による アガロースゲルからのDNA回収における問題点の解消

Resolution of technical issues on DNA recovery from agarose gel by ViewaBlue® Stain KANTO

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品工学研究領域

高橋 宏和、松本 敦子、金原 浩子、杉山 滋、小堀 俊郎

Hirokazu Takahashi, Atsuko Matsumoto, Hiroko Kanahara, Shigeru Sugiyama, Toshiro Kobori
Food Engineering Division, National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization

関東化学株式会社 技術・開発本部 伊勢原研究所 生化学研究室 山嵎 裕之、千室 智之

Hiroyuki Yamazaki, Tomoyuki Chimuro
Isehara Research Laboratory, Technology & Development Division, Kanto Chemical Co., Inc.

関東化学株式会社 試薬事業本部 試薬部 技術部 バイオケミカル課 小林 崇良

Takayoshi Kobayashi
Biochemicals, Reagent Development Department, Reagent Division, Kanto Chemical Co., Inc.

In this paper, we describe the results of DNA staining with ViewaBlue® Stain KANTO, a reagent for recovering DNA from agarose gels. ViewaBlue® stained DNA migrated as a band in the gel after or during electrophoresis, and DNA bands were easily visualized under natural light. The DNA recovered from the band showed little damage because the visible light spectrum only slightly covers ultraviolet wavelengths in the laboratory environment. In addition, ViewaBlue® had little mutagenicity; therefore, ViewaBlue® provides a simple and safe means of performing experimental procedures including staining, observation, and recovery of desired DNA without dedicated devices.

1. はじめに

デオキシリボ核酸(DNA)やリボ核酸(RNA)を検出する際、アガロースゲルによる電気泳動で分離した試料をエチジウムブロミド(EtBr)によって染色し、ピーク波長が260 nmの紫外線(UV-C)を照射することによって可視化することが一般的である。染色方法は二通りに大別され、予めEtBrを添加してアガロースゲルを作製して電気泳動に使用する、いわゆる「先染め」と、EtBrを添加せずにアガロースゲルを作製し、電気泳動後にEtBr染色液に浸す「後染め」である。「先染め」は電気泳動中に核酸の分離状況を確認することが可能であり、泳動後にゲルを染色する必要がないことから検出時間が短縮できる。ただし、EtBrは変異原性物質¹⁾であるため、ゲルや電気泳動緩衝液の取り扱いには注意を払う必要がある。「後染め」は、電気泳動緩衝液の取扱いは簡便であるが、検出まで時間がかかる(約30分)、染色液や染色後のゲルの取り扱いには注意が必要である。このよ

うに、いずれの方法にも長所と短所があるためどちらを採用するかは研究室によって異なるものの、EtBr染色は試薬の安定性、ランニングコスト、高い検出感度の点から、アガロースゲル電気泳動での核酸検出に汎用されている。

アガロースゲルで分離したDNAをゲルから回収して別の実験(例えば塩基配列解析やクローニング)に使うことがしばしばあるが、EtBr染色ではアガロースゲルからDNAを回収する工程で細心の注意を払わないと継続して行う実験がうまくいかない。DNAはチミンやシトシンのピリミジン塩基とアデニンとグアニンのプリン塩基から構成されるが、このピリミジン塩基が2つ近接しているときにUV-Cが照射されると、2個の塩基間で架橋が生じてピリミジンダイマー(図1)が形成される²⁾。ピリミジンダイマーが生成したDNAは、PCRや塩基配列解析の反応の鋳型としても、またはプラスミド等を利用した大腸菌などの宿主細胞によるクローニングにおいても著しく効率が低下する。そのためアガロースゲル中のDNAを回収する

場合には工夫が必要となる。すなわち、DNAを確認用レーンと回収用レーンの二つのレーンに分けて泳動を行い、確認用レーンにだけ紫外線を照射して目的DNAの位置を確認する一方で、回収用レーンではアルミホイル等で覆うことにより紫外線を照射せず、確認用レーンでの位置を参照して目測で目的DNAを切り出す(図2)、といった手技がとられる。またこの操作は、確認用レーンから目的DNAを目視で確認するために暗室で行い、さらに実験者を有害な紫外線から目や皮膚を防御するために専用の保護具を使用するといった結構手間のかかる手法が未だに使われている。また、現在ではUV-CのみならずUV-AやBの照射を選択できる機器があり、UV-C

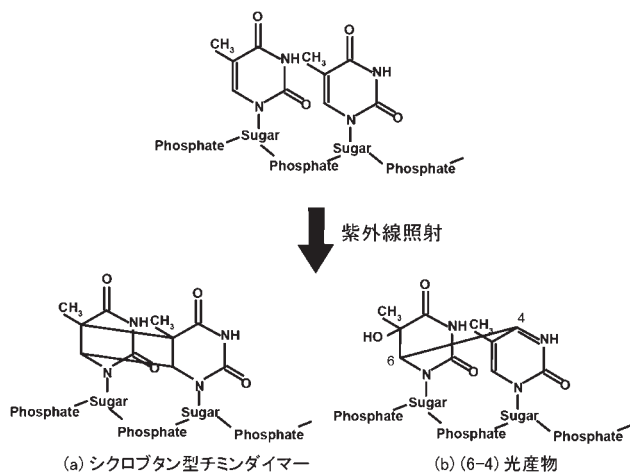


図1 紫外線照射によって形成される主なピリミジンダイマー

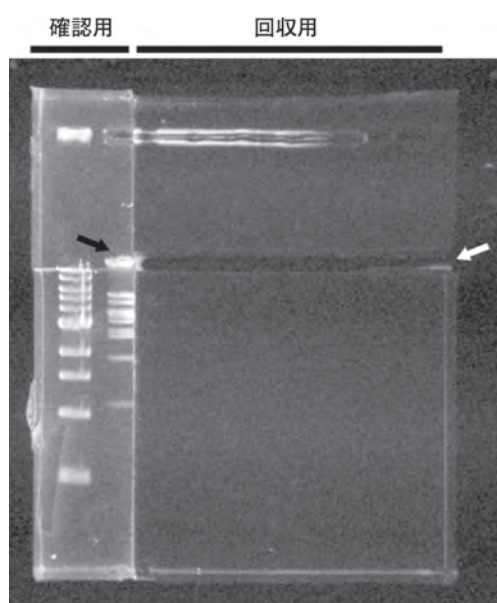


図2 EtBr染色におけるアガロースゲルからの目的DNA断片の回収
確認用ゲルの目的DNA(黒矢印)を目安として、回収用ゲルから目的DNA
が有ると予想されるゲル部分(白矢印)を切り出し、回収する。

照射に比べてEtBrの蛍光強度が減少するものの、DNAへのダメージを低減させることを第一に考えてUV-AやUV-Bで作業を行うこともある。ただし、暗室でUV照射を短時間で行う必要があるなど、UV-C照射と同様に操作上の制約がある。

そのためDNA回収を簡便に行うために、近年EtBrに代わる様々な核酸検出用蛍光色素が各社から販売されている。これらの蛍光色素は励起波長が紫外光ではなく可視光(400-800 nm)であるため、DNAに対するダメージはほとんどない。しかし、暗室等に加えて可視光を照射する専用の機材と試薬が必要であり、新たにシステム導入のための初期投資が必要となる³⁾。多くの研究室には既にEtBr染色用の機材が導入されているため、アガロースゲルからのDNA回収のためだけにこうした試薬や機材を新たに導入するのにはいささか抵抗があると思われる。

2. 塩基性核酸染色試薬

アガロースゲルにおける核酸染色試薬としては非蛍光の染色薬、例えばメチレンブルー等の塩基性の染色薬が古くから知られている⁴⁻⁵⁾。これらの塩基性染色試薬の中でも酢酸カーミン溶液は、小中学校の顕微鏡観察でも細胞の核を染めるのにも使われているので聞き覚えがある人も多いかと思う。核酸はその構造中に多数のリン酸基があるため全体として負電荷を帯びた分子であり、正電荷を帯びている塩基性染色試薬と静電的に結合する。また、色素自身が特定の色を有しているためDNA検出に紫外線照射や検出用機器が不要である。さらに核酸との結合様式がEtBrとは異なり2本鎖DNA内にインターカーレートしないため、使用者にとっても安全な核酸染色試薬として認知されている。一方、塩基性の核酸染色試薬は染色液の調製が煩雑であることに加えて、検出時間が長く感度が低いといった短所があるため⁶⁻⁷⁾、通常の分子生物学実験で用いられることは少ない。

アガロースゲルからのDNA回収における問題点を踏まえて、筆者らは導入費用が安価で、DNA回収に十分な検出感度を持ち、かつ簡便で安全性の高いDNA染色試薬の開発を要望していた。本稿では、DNA回収に適した新しいDNA染色試薬であるViewaBlue® Stain KANTO(以下ViewaBlue®)の使用事例を報告する。

3. ViewaBlue® Stain KANTOによるDNA染色

ViewaBlue®によるアガロースゲルのDNA染色には、EtBr染色と同様に「先染め」と「後染め」の2通りの染色方法が選択できる。一般的な塩基性のDNA染色試薬が「後染め」であるため利便性が向上したと言える。そこで、各染色方法で検出までにかかる時間と検出感度を評価した。この際、試料DNAとしてプラスミドDNAのpAcGFP-1(クローンテック社)を制限酵素EcoRIで切断して精製した後、段階希釈により様々な濃度に調製したDNA溶液を用いた。

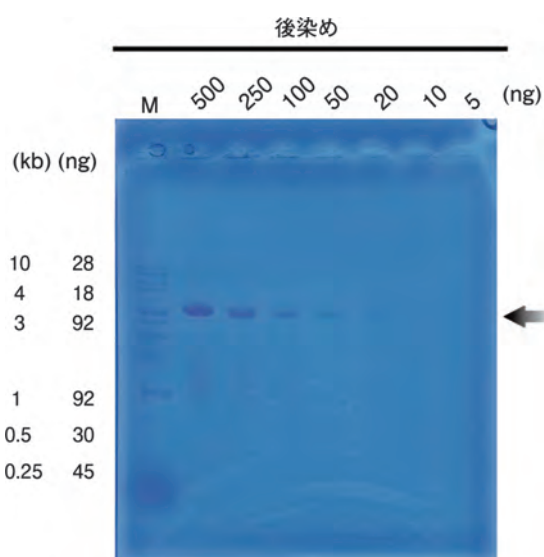


図3 後染めにおけるViewaBlue® Stain KANTOの検出感度
レーン上部の数字は泳動に使用したDNA量(ng)を示す。また、黒矢印は目的DNA(pAcGFP-1, EcoRI切断済み)の位置を示す。

初めに、「後染め」法において検出までに要する作業時間と検出感度を検討した。アガロースゲル電気泳動(約30分間)後、ゲルをViewaBlue®に浸し、5分間静置した。その後、ゲルを精製水に浸して5分間振盪する脱色作業を2回繰り返した後、自然光下で目的DNAを観察した(図3)。「後染め」における作業時間は電気泳動の時間を含めても1時間以内に終了するため、EtBr染色の「後染め」と同程度である。ゲルに白色光を照らし、コントラストを上げると、目視で約5~10 ngのDNAが確認でき、EtBr染色したゲルをポラロイドカメラで撮影した場合には4 ng程度のDNAが確認できることから、検出感度も同程度であった。ちなみに、脱色作業を30分程度延長すればより鮮明な泳動像を得ることができる。

次に、「先染め」での検出までに要する作業時間と検出感度を検討した。ViewaBlue®を最終濃度で1%となるように添加したアガロースゲルと泳動用緩衝液(1xTAE)を電気泳動に使用した。電気泳動中にDNAバンドが観察できるかどうかを検討するため、泳動開始から15分および30分後に自然光下で目的DNAを観察した(図4)。泳動像そのものは「後染め」に比べて分離能が劣るが、白色光下の目視では、約20~50 ng程度のDNAが視認された。「後染め」法と比べると、ゲルおよび泳動用緩衝液の作製に多少の手間がかかる上、検出感度も低下しているが、泳動中あるいは泳動後すぐに観察できるため、DNA回収等の作業に速やかに移ることができるという利点がある。

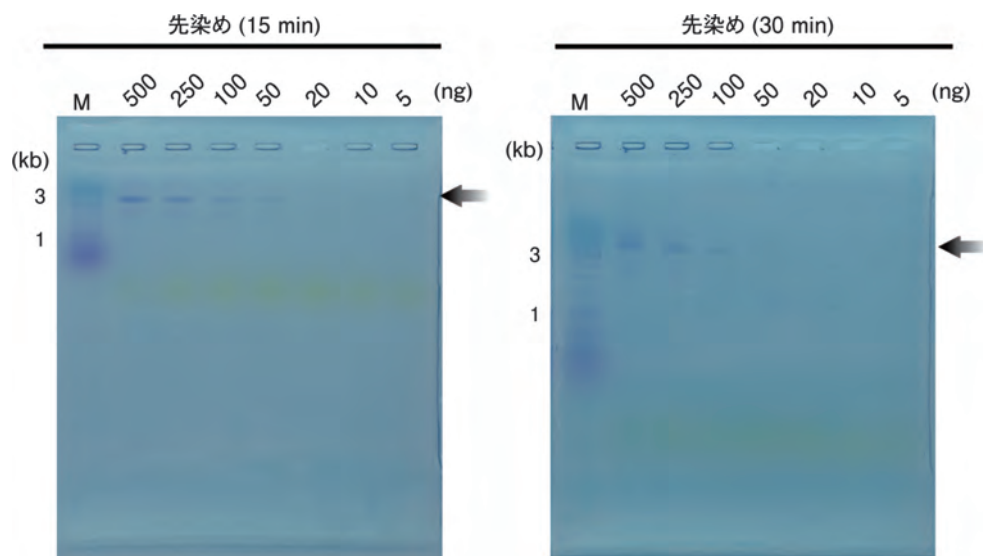


図4 先染めにおけるViewaBlue® Stain KANTOの検出感度
左は泳動後15分後、右は30分後に観察。レーン上部の数字は泳動に使用したDNA量(ng)を示す。また、黒矢印は目的DNAの位置を示す。

市販のDNA回収用キットを用いてDNAを回収する場合、100 ng以上のDNAを回収用アガロースゲル電気泳動に供することが一般的である。ViewaBlue®を用いた「後染め」と「先染め」では20 ng程度のDNAが確認できるため、キットを用いた通常のDNA回収法にそのまま適用できる。従って、ViewaBlue®の試薬としての安全性や可視光下で作業できる簡便性等を考慮すれば、電気泳動におけるDNA検出や回収においてViewaBlue®はEtBr染色等の蛍光系染色試薬より使い勝手がよいだろう。

しかし、蛍光系DNA染色試薬とは異なり、ViewaBlue®を用いたDNA検出には2つの課題がある。1つは、目視で非常に薄くしか見えないDNAバンドをデジタルカメラ等で記録することが難しく、露光やシャッタースピードで強度を上げられる蛍光試薬による染色とは異なる。2点目として、一般的な泳動用のローディングダイに含まれる色素であるプロモフェノールブルーやキシレンシアノールと色調が干渉することが挙げられる。ViewaBlue®で染色した場合、これらの色素と標的DNAのバンドとが重なると両者を区別することができない。そのため、ViewaBlue®用のローディングダイには色調が異なるオレンジGのみを添加した別売の6倍濃縮ローディングバッファー オレンジGを使用することが望ましい。

4. アガロースゲルからの回収効率の比較

アガロースゲルからのDNAの回収効率について、自然光下で作業できるViewaBlue®と、UV-C下で行うEtBr染色、および青色光下で行うSYBR-Safe(インビトロジェン社)と比較した。前述の制限酵素EcoRIで切断した3 µgのpAcGFP-1を電気泳動したゲルをそれぞれの染色試薬で「後染め」した後(図5)、pAcGFP-1のバンドを切り出し、DNA回収用キットであるWizard Gel and PCR purification system(プロメガ社)を用いて切り出したアガロースゲルからDNAを回収した。回収DNA量はどの染色方法を用いても大きな差は見られなかった。現在市販されているDNA回収用キットは、高濃度のカオトロピック塩存在下でDNAをシリカメンブレンやシリカビーズに選択的に吸着させるものが主流である。そのためViewaBlue®によってDNAのシリカへの吸着が阻害される可能性も考えられたが、実際にはほとんど影響しないことが確認された。また、エタノール含有溶液で洗浄する工程で、DNAに吸着しているViewaBlue®はDNAから遊離して洗い流されたため、UV吸光度測定や蛍光試薬による回収DNAの濃度検定には影響しなかった。

回収した各々のDNAの一部(25 ng)は、20 µlでライ

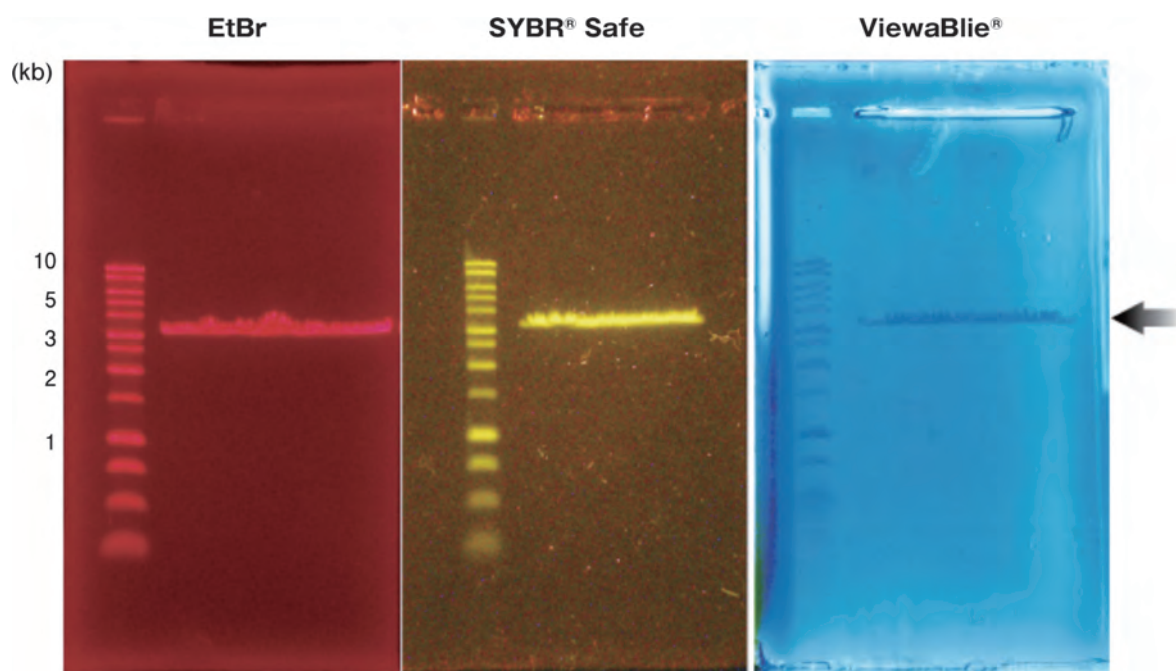


図5 アガロースゲルからの目的DNAの回収。

アガロースゲルに、それぞれ3 µgのEcoRI切断したpAcGFP-1を泳動後、EtBr、SYBR®Safe、ViewaBlue® Stain KANTOで染色後、EtBr染色は紫外線で、SYBR®SafeはSafe Imager™ blue light transilluminator(インビトロジェン社)と専用フィルターで可視化した。ViewaBlue® Stain KANTO染色したゲルは、スキャナーで画像を取り込んだ。黒矢印は目的DNA(pAcGFP-1, EcoRI切断済み)を示す。

ゲーション反応を行い、そのうち5 μ l (DNA量で6.25 ng)を用いて大腸菌を形質転換することにより、回収したDNAの品質を評価することとした。もし回収DNAにピリミジンダイマーのような損傷が入っていれば、形質転換されて生育できる大腸菌のコロニー数が減少する。EtBr染色とUV-Cの組み合わせでは、DNAにピリミジンダイマーが生成することが知られているため、UV-Cは15秒間と30秒間照射する試験区を設けた。その結果、青色光照射下で作業を行うSYBR®-Safe染色と、自然光下で作業するViewaBlue®染色では、非常に多くの形質転換された大腸菌コロニーが観察された(図6)。一方、EtBr染色したゲルから回収したDNAを用いた場合は、UV-Cの照射時間が長くなるにつれて形質転換体のコロニー数が減ることが明らかとなった。以上の結果から、自然光下で作業できるViewaBlue®染色したアガロースゲルから回収したDNAを用いたクローニング効率は、DNA損傷が生じないSYBR®-Safeで染色した場合と同程度であった。つまりViewaBlue®を用いた場合でもUVを用いないためゲルからの回収時にDNAに損傷が入らず、その後の実験に適用できることが判明した。

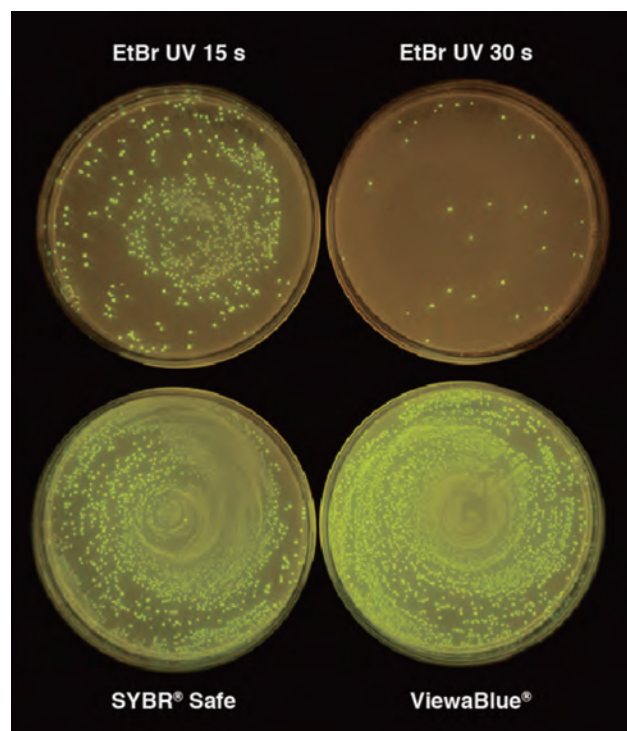


図6 回収したDNAの損傷度の比較

pAcGFP-1によって形質転換された大腸菌は蛍光タンパク質であるGFPを発現するため、GFPを発現した形質転換体のコロニーを可視化した。SYBR®SafeおよびViewaBlue® Stain KANTOで染色したゲルから回収したプラスミドDNAを用いた場合、非常に多くの形質転換されたコロニーが観察される。一方でEtBr染色後に紫外線照射されたDNAは、照射時間の増加に伴ってDNAが損傷するため、形質転換体のコロニーの数も減少する。

5. おわりに

EtBr染色したアガロースゲルにUV-Cを照射して移動度を確認した後にDNAを回収してクローニングを行うと、ピリミジンダイマーの形成により著しく効率が低下する。また、EtBrは変異原性物質であるため、染色廃液や観察後のゲル等の廃棄物の処理方法については以前より議論の対象となっている。ViewaBlue®によるアガロースゲル染色の利点は、EtBrで認められる上述の課題を克服できることである。蛍光系染色試薬とは異なり、観察に特別な機材を必要としない、または滅菌蒸留水で脱色できる等、利便性が高く一般的な研究室であればすぐに導入できる。一方、ルーチンで電気泳動像を観察するには、写真撮影で融通が利く蛍光系染色試薬の方が優れていると思われる。そのため我々の研究室では、電気泳動像を撮影する際には蛍光系染色試薬でゲルを染色し、DNA回収にはViewaBlue®を使っている。特にアガロースゲルからのDNA回収は、作業工程の多さや安全性を考えるとViewaBlue®を使うメリットは大きい。また、検出条件によっては、EtBrに近い検出感度である上に利便性や安全性が高いため、大学や高校教育における学生実験でも十分活用できる核酸染色試薬である。

参考文献

- 1) Singer, V. L.; Lawlor, T. E.; Yue, S. *Mutat. Res.* 1999, 439, 37-47.
- 2) Cariello, N.F.; Keohavong, P.; Sanderson, B.J.; Thilly, W.G. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 4157.
- 3) Martineau, C.; Whyte, L.G.; Greer, C.W. *J. Microbiol. Methods.* 2008, 73, 199-202.
- 4) Flores, N.; Valle, F.; Bolivar, F.; Merino, E. *BioTechniques.* 1992, 13, 203-205.
- 5) Adkins, S.; Burmeister, M. *Anal. Biochem.* 1996, 240, 17-23.
- 6) Turgut-Balik, D.; Çelik, V.; Moreton, K.; Brady, R.L. *Acta Biol. Hung.* 2005, 56, 389-397.
- 7) Raymer, D.M.; Smith, D.E. *Electrophoresis.* 2007, 28, 746-748.