

# 電気泳動プロトコール

## 実験機器および器具

- 大型電気泳動槽（日本エイドー，NB-9605）
- 幅1mm、17Wellのアクリルコウム（日本エイドー）※写真を参照
- パワーサプライ（BIO RAD, POWER PAC100）
- UVトランスイルミネーター（TOYOBO, FAS-III）
- フィルム（SONY, UPP-110HG）
- フラスコ
- 電子天秤

## 試薬

- TBE バッファー ※組成表を参照
- アガロース（ナカライテスク 011-53 もしくは SIGMA A9539-100G）
- エチジウムブロマイド（10ng/ $\mu$ L） ※組成表を参照
- BPB 溶液（和光純薬工業）
- DNA サイズマーカー（ $\phi$ x174HincIII など，25ng/ $\mu$ L）：BioLabs N3026L

## アガロースゲル濃度の選択

アガロースゲルの濃度（質量/体積）	分離する DNA のサイズ（bp）
0.7%	800~10,000
1.0%	500~7,000
2.0%	100~2000
4.0%	80~500

目的の DNA 断片サイズに見合った濃度を選択する。

## 方法

1. 必要量のアガロースを秤量し、0.5×TBE バッファー中に入れてよく混和する。
2. 電子レンジで暖めて溶解する（突沸に注意）。
3. マグネットスターラーで混合する。
4. 溶液が冷えてきたら、エチジウムブロマイド（EtBr）を加えよく混合する（EtBr はゲル 100mL あたり 1 $\mu$ L 添加する）。
5. フラスコを素手で触って熱くない程度になったら、水平になっているトレイにゆっく

り流し込む。トレイの両端はセロハンテープで止めておく。

6. コームがトレイの底面から 1mm 程度浮くように差し込み、固まるまで放置する（固まった後、すぐに使用しない時はサランラップを張って、冷蔵保存する）。
7. 泳動槽にゲルが沈むまで 0.5×TBE 緩衝液を入れ、コームを静かにはずす。
8. サンプル DNA に対して、1/5 倍量の BPB 溶液を加える。
9. 各ウェルにサンプルを入れる。DNA サイズマーカー（サンプル DNA 断片サイズにあったものを使用）を左端、もしくは中央に入れる。
10. アガロースゲル 10cm あたり 100V 前後の電圧をかけ電気泳動する（泳動時間はサイズにより調節する）。
11. 泳動終了後、UV トランスイルミネーター上にゲルを置き、UV で照らす。
12. 泳動パターンを確認し、必要に応じて写真に記録する。

## ※組成表

### ① 2×TBE

試薬	製造元	グレード	最終濃度	使用量
Tris	ナカライテスク 35406-75	特級試薬	178mM	64.8g
Boric Acid	ナカライテスク 052-15	特級試薬	178mM	33g
EDTA	ナカライテスク 151-11	特級試薬	4mM	4.48g
超純水 (Milli-Q)	MILLIPORE	滅菌不要	-	2.5L
超純水 (Milli-Q)	MILLIPORE	滅菌不要	-	+ α
計				3L

1. それぞれの試料を計り、ビーカーに入れて溶かす。
2. 最終液量までメスアップする。

### ② 10mg/ml エチジウムブロマイド

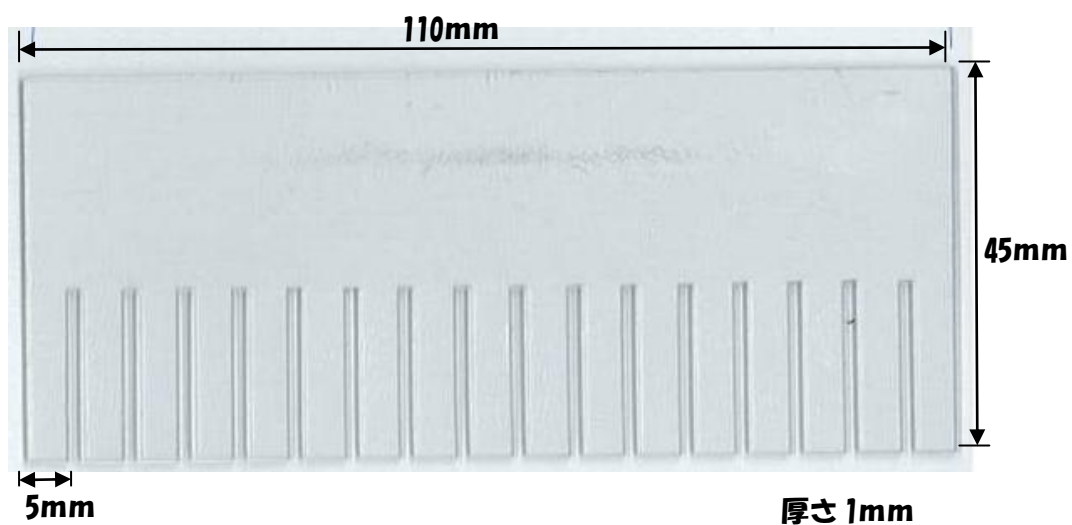
エチジウムブロマイドは、2本鎖 DNA の鎖の間に入り込む蛍光試薬であり、強力な発癌作用と毒性がある。取り扱いには必ず手袋をはめ、粉末の計量にはマスクを着用すること。

また、エチジウムブロマイドの廃液は必ず処理した後に捨てること。

試薬	製造元	グレード	最終濃度	使用量
E+Br	ナカライテスク 146-03	特級試薬	10mg/mL	5g
超純水 (Milli-Q)	MILLIPORE	滅菌済み	-	500mL
計				約 500mL

1. 褐色瓶あるいは遮光できる容器に E+Br を入れ、滅菌水を入れてスターラーで溶かす。
2. 溶けにくいのでスターラーで 1 時間ほど攪拌する。
3. 常温で保存する。

※コウム写真



参考文献

- (1) 細胞工学 別冊 バイオ実験イラストレイテッド (秀潤社)
- (2) 細胞工学 別冊 PCR Tips (秀潤社)
- (3) ナカライテスク 総合カタログ (ナカライテスク)

2008/4/25 Nakaniishi