



核酸染色試薬の検討

二つの留意点をご紹介します

**エチジウムブロマイド
(EtBr)**

ミドリグリーン

理化学研究所
バイオリソース研究センター

実験植物開発室

<https://epd.brc.riken.jp/ja/>

- EtBr 変異原性があり発がん性も疑われる。⁽¹⁾
- ミドリグリーン 非発癌性で、EtBrよりも低い変異原性を示す。⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾

リソースの品質検査では、リソースの特性に応じたPCRでDNAを増幅し、アガロース電気泳動を実施しています。

今回、強い変異原性があるEtBrから非発癌性ミドリグリーンへの核酸染色試薬変更時に実施した検討実験で、判明した二つの留意点をご紹介します。

目次

1. アガロースゲル保存容器の選択について (Tip1)

DNA染色試薬に適したアガロースゲル保存溶液の選択 2

ミドリグリーンエクストラ含有のアガロースゲル保存容器テスト 3

2. アガロースゲル保存方法 (Tip2)

保存は4℃プラス遮光、保存の基本に忠実に 4

1st~4th week 保存ミドリグリーンエクストラ含有アガロースゲル電気泳動テスト 5

3. まとめ 6

DNA染色試薬に適した アガロースゲル保存容器の選択

ミドリグリーンには3種類の染色液シリーズがあります。実験植物開発室ではアガロースゲルをまとめて作り、保存容器からアガロースゲルを取り出して泳動を行う実験スタイルです。そのスタイルに適した先染め法ができる**ミドリグリーンエクストラ**の使用を試みました。

- ① ミドリグリーンエクストラを含むアガロースゲルを、ミドリグリーンエクストラの吸着性が高い特性をもつ保存容器でゲルを保存すると、保存液(TAE)とアガロースゲルに含まれるミドリグリーンエクストラが溶出し、ゲルのDNA染色能力が低下することがわかりました。(Fig.1 Fig.2 Fig.3)
- ② 実験植物開発室ではプラスチック容器3種類試しましたが、保存に適した容器はBOX1でした(Fig.1)。
- ③ EtBr含有アガロースゲルにおいてはプラスチック容器3種類で試しましたが、保存容器によるDNA染色の違いはなく3種類すべてが保存容器として使用可能でした。
(5)
- ④ DNA染色試薬であるSYBR Green II はガラス表面あるいはpolyethylene 製容器に吸着することがメーカー説明書に記載されていました。

保存容器
気を付けて



ナズナちゃん

■ ミドリグリーンエクストラ含有のアガロースゲル保存容器のテスト

保存容器

- 3種類の保存容器でテスト
- BOX1 DAISO ポリプロピレン 商品名 フタ付きお道具箱
- BOX2 岩崎工業株式会社 ポリプロピレン
- BOX3 蝶プラ工業株式会社 ポリプロピレン 商品名 タイトボックスロング

テスト方法

- ミドリグリーンエクストラを含む2%アガロースゲルを等濃度ミドリグリーンエクストラを含むTAEバッファードで室温あるいは4℃で、遮光状態で1か月間保存
- 容器とTAEバッファードの着色を観察(Fig.1 Fig.2 Fig.3)
- 保存したアガロースゲルで電気泳動を実施(Fig.4 Fig.5)



BOX1
だけOK!

カモジくん



Fig.1 BOX1 保存容器として使用可能

バッファードには着色が残り容器への吸着が確認できなかった。

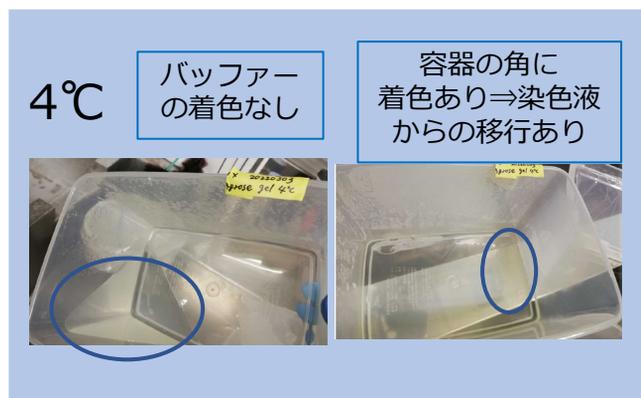


Fig.2 BOX2

保存容器として使用不適

バッファード中のミドリグリーンエクストラを確認できず、容器への吸着を確認した。



Fig.3 BOX3

保存容器として使用不適

容器へのミドリグリーンエクストラの吸着を確認し、一緒に保存していたアガロースゲル板への着色も確認した。

Tip2

やっぱり保存は4℃プラス遮光、 保存の基本に忠実に

- ① Tip1で使用したBOX1とBOX2を使用して、ミドリグリーンエクストラを含むアガロースゲルを1～4週間保存し、電気泳動を行いました。Tip1で染色液の付着が観察できなかった容器のBOX1に、4℃暗所保存したアガロースゲルでの電気泳動の蛍光強度が一番高い結果となりました。(Fig.4 Fig.5)
- ② 電気泳動のDNAフラグメントの蛍光強度より、保存条件によるミドリグリーンエクストラの保存性の高さは

I > II > III でした。

I	保存容器	BOX1	保存条件	4℃暗所(Fig.4)
II	保存容器	BOX1	保存条件	室温暗所(Fig.4)
III	保存容器	BOX2	保存条件	4℃暗所(Fig.5)

やっぱり
4℃ね!!

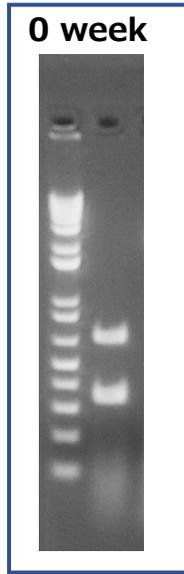


ナスナちゃん

参考文献

- (1) 田村隆明 羊土社 バイオ試薬調製ポケットマニュアル
- (2) <https://www.n-genetics.com/products/1072/1024/16850.pdf>
- (3) <https://www.n-genetics.com/products/1072/1024/13208.pdf>
- (4) <https://www.n-genetics.com/products/1072/1024/13326.pdf>
- (5) https://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/5760a_5761a_5770a_5771a_j.pdf

■ 1st~4th week 保存ミドリグリーンエクストロ含有アガロースゲル電気泳動テスト



テスト方法

- BOX1(Fig.1)とBOX2(Fig.2)を使用した。
- 遮光条件で、室温保存と4℃保存を比較 (Fig.4 Fig.5)
- ミドリグリーンエクストロを含む2%アガロースゲルを等濃度ミドリグリーンエクストロを含むTAEバッファーで保存後、電気泳動を行いDNA染色の経時的な劣化を観察



Fig.4

Fig.1 のBOX1で保存したアガロースゲルを使用した電気泳動結果
保存容器として使用可能なBOX

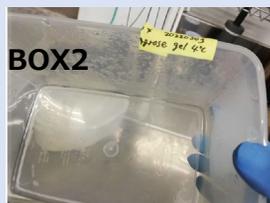
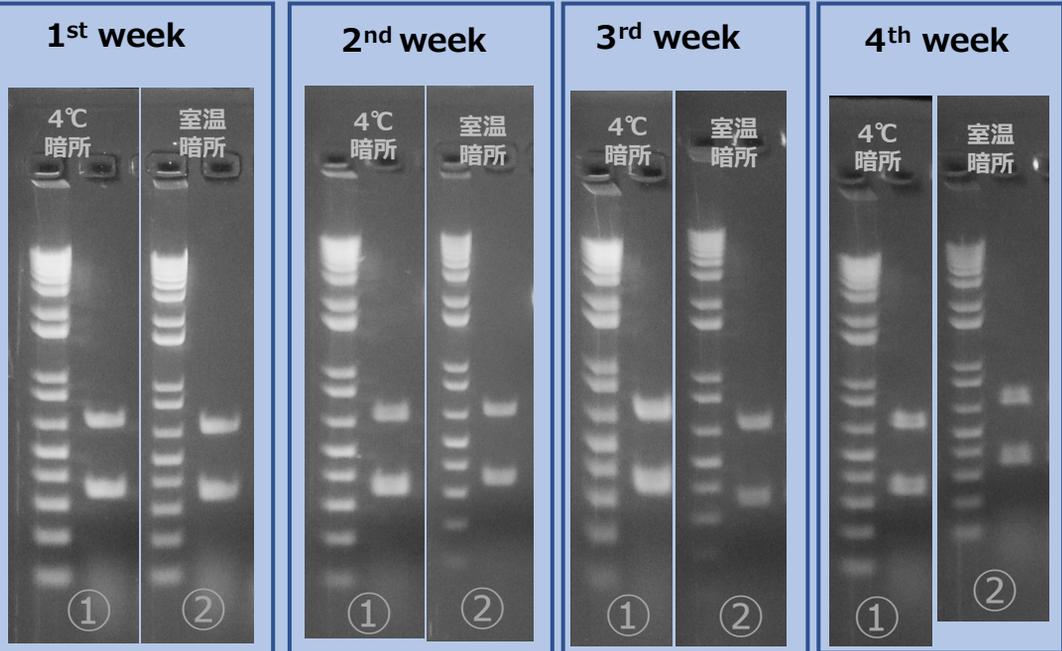
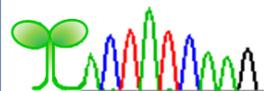
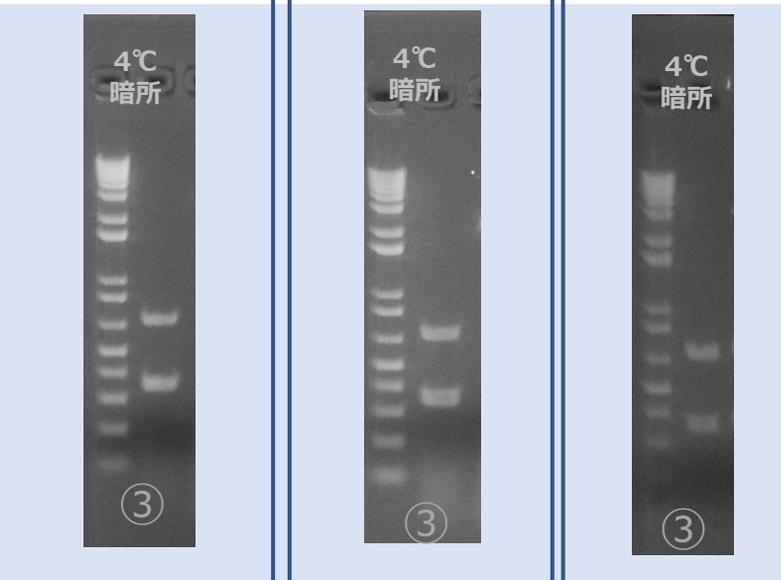


Fig.5

Fig.2 のBOX2で保存したアガロースゲルを使用した電気泳動結果
保存容器として使用不適なBOX



■ まとめ

- 今回の検証結果から実験植物開発室では、PCR反応液に直接添加してDNA染色できる**ミドリグリーンダイレクト**を使用することにしました。今まで通りゲルを作り置くスタイルはそのままにすることで、DNA染色液変更に対するメンバーへの負担を軽減できました。また保存容器選定の必要もなくなりました。
- 先染めで染色して**ミドリグリーンアドバンス**を使用しているBRC内の他研究室では、アガロースゲルは作り置きせず必要時に作成しています。その場合も保存容器の選定は必要はありません。
- BRC内の各研究室では、**ミドリグリーンダイレクト**や**SYBR Green**、**Gel Green**、**Gel Red**等を使用してDNA染色を行っています。各室での実験装置、実験スタイルにあった染色試薬の選択をしています。
- これまで便利に使用していたEtBrから、より安全性の高い染色液の使用へと模索が進行しています。

私たちは高い品質のバイオリソースを維持、提供するために、常に品質管理の方法の検討と改良を行っています。

実験植物開発室のバイオリソースはこちらからどうぞ



<https://plant.rtc.riken.jp/resource/home/index.html>



メールでの問い合わせはこちらへ
plant.brc@riken.jp