

バイオ実験キット Dr.ジーンシリーズ

Dr.ジーン 9

アガロースゲル電気泳動セット

取扱説明書 第2版

株式会社ニッポンジーン

富士フィルム和光純薬株式会社

目次

1. 本キットについて	2
2. キット内容	
キット構成	3
キット以外に必要なもの	4
3. 使用上の注意	6
4. 準備・操作	
1) 電気泳動バッファー(1×TAE)の調製	9
2) アガロースゲルの作製	10
3) 染色液の調製	13
4) 実験操作：電気泳動	14
5. 廃棄物の処理	17

1. 本キットについて

本キットは、教育用バイオ実験キット Dr.ジーンシリーズの「Dr.ジーン7 植物多型解析 PCR キット」、「Dr. ジーン 8 DNA 鑑定キット」の補助セットであり、アガロースゲル電気泳動に必要な試薬が全て揃っています。

「Dr.ジーン7 植物多型解析 PCR キット」、「Dr. ジーン 8 DNA 鑑定キット」を使用されない場合でも、本キットで安全にアガロースゲル電気泳動を行うことができます。

染色試薬には、発がん物質を含まない試薬を用いており、安全に目視での観察を行うことができます。UV イルミネーター等特別な装置を準備する必要はありません。

2. キット内容

1) キット構成

製品名称 (内容)	容量	数量	保存	チェック
Agarose S (アガロース)	5 g	1	室温	<input type="checkbox"/>
50×TAE (電気泳動バッファー)	100 ml	1	室温	<input type="checkbox"/>
Gene Ladder Wide 1 (マーカーDNA)	500 µl	1	室温	<input type="checkbox"/>
6×Loading Buffer Orange G (ローディングバッファー)	1 ml	1	室温	<input type="checkbox"/>
CLEAR STAIN Blue (核酸染色用試薬)	120 ml	1	室温	<input type="checkbox"/>

※ 本キットは、6 班構成の Dr.ジーンシリーズ「Dr.ジーン 7 植物多型解析 PCR キット」、「Dr. ジーン 8 DNA 鑑定キット」に必要な試薬が十分量揃っています。

※ 本キットは、電気泳動装置として MARINE23ST (富士フイルム和光純薬株式会社、以降 wako #298-35271) や Mupid-2plus (株式会社ミューピッド、以降ミューピッド) などの小型サブマリン電気泳動装置を各班 1 台ずつ、最大 6 台を使用することを想定した量の試薬が含まれています。その他の電気泳動装置を使用されると、泳動層の容量やゲルサイズが異なる場合があります、試薬が不足する恐れがあります。

※ 本キットの構成品は、単品で別途ご購入いただけます。

2) キット以外に必要なもの

	補足	チェック
マイクロピペット：～20 μl 用	サンプルをアプライする際に使用します。	<input type="checkbox"/>
マイクロピペット用チップ	オートクレーブ滅菌済が望ましいですが、未滅菌でも構いません。	<input type="checkbox"/>
電気泳動装置一式 (電気泳動槽、パワーサプライ、ゲル作製台、ゲルトレイ、コーム)	「Dr. ジーン 9 アガロースゲル電気泳動セット」は MARINE23ST(wako #298-35271) の使用を想定して作られています。Mupid-2plus などの他の小型電気泳動装置でも使用できます。電気泳動の際は感電しないように十分注意してください。	<input type="checkbox"/>
サンプル	(DNA を含む溶液)	<input type="checkbox"/>
電子レンジ	ガスバーナー等で代用が可能です。	<input type="checkbox"/>
滅菌用エタノール (70%程度)	実験台を拭く際に使用します。	<input type="checkbox"/>
廃棄チップ入れ	使用済みチップを入れます。 ビーカーや半分に切ったペットボトルでも使用可能です。	<input type="checkbox"/>
5 L 以上の容器	1×TAE 調製の際に使用します。	<input type="checkbox"/>
メスシリンダー	1×TAE 調製の際に使用します。	<input type="checkbox"/>
スターラー	1×TAE 調製の際に使用します。	<input type="checkbox"/>
試薬瓶・ビーカー	必要であれば、試薬を各班に分けてください。	<input type="checkbox"/>
マイクロチューブ	本キットを「Dr. ジーン 7」、「Dr. ジーン 8」(6 班構成) と組み合わせて使用する場合、事前に各班で使用する分の試薬を小分けしておくの実験の進行がスムーズです。(分注量詳細は、「4. 準備・操作 (試薬の準備)」をご確認ください。)	
タッパー、トレイなど	染色専用容器、脱色用容器として使用します。青色の色素が付着します。汚れてもいいものを準備してください。	<input type="checkbox"/>
薬包紙、薬さじ、はかり	アガロースを量り取る際に使用します。	<input type="checkbox"/>
500 ml 三角フラスコ	アガロースゲルを作製する際に使用します。	<input type="checkbox"/>
ラップ	電子レンジを使用して、アガロースゲルを溶解する際に使用します。	<input type="checkbox"/>

爪楊枝、または、針など	電子レンジを使用して、アガロースゲルを溶解する際にラップに穴をあけるため使用します。フラスコ内の圧力が下がり、ラップを取る際、アガロースゲルが飛び散るのを防ぎます。	<input type="checkbox"/>
耐熱手袋	アガロースを溶かす途中、電子レンジから三角フラスコを取り出すときがあると便利です。軍手を重ねたり、吹きこぼれによるやけどを防ぐために軍手の上にビニール手袋をしたりすることで代用可能です。	
染色液廃液用容器、活性炭	染色液や 1×TAE を廃棄する際に使用します。詳細は、「5. 廃棄物の処理」をご参照ください。	<input type="checkbox"/>
使い捨て手袋、フライ返しなど	染色液よりゲルを取り出す際に使用します。	<input type="checkbox"/>

3. 使用上の注意

- ◆ 本品は試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用できません。また、試薬についての基本的な知識を十分に理解した上で使用してください。
- ◆ 本品の取扱いは、マニュアルの記載通りに行ってください。マニュアルの記載内容と異なった取り扱いによるトラブル、事故につきましては、弊社では責任を負いかねます。
- ◆ 本品の仕様は、ご使用になったお客様のご意見等を参考に予告なく変更されることがあります。
- ◆ 火傷には充分注意してください。

4. 準備・操作

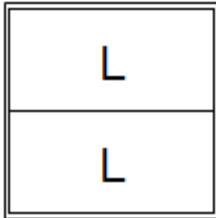
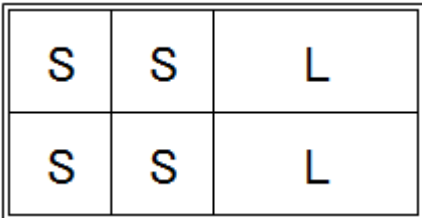
電気泳動装置として MARINE23ST (Wako) を使用した場合を想定しています。

以下の試薬の調製には水を使用します。できればイオン交換水、または蒸留水を使用してください。もし無い場合には水道水を使用してください。

< 試薬の分量一覧 >

ミューピッドの Mupid-2plus 泳動槽を使用される場合に必要な試薬も、本キット内にそろっています。別途購入する必要はありません。他の電気泳動装置でご使用になる場合は必要な試薬をご確認ください。

ゲル作製の手順は同じですが、一度に作製できるゲルの枚数が MARINE23ST (Wako) と Mupid-2plus (ミューピッド) では異なります。以下の表を参考にしてください。

	MARINE23ST(Wako)	Mupid-2plus (ミューピッド)
最大ゲル作製枚数		
試薬使用量	<u>1.5 %アガロースゲル</u> AgaroseS 1.5 g <u>1×TAE</u> 100 ml	<u>1.5 %アガロースゲル</u> AgaroseS 3 g <u>1×TAE</u> 200 ml
	<u>1 %アガロースゲル</u> AgaroseS 1 g <u>1×TAE</u> 100 ml	<u>1 %アガロースゲル</u> AgaroseS 2 g <u>1×TAE</u> 200 ml
泳動槽 1 台分の 1×TAE 量	約 230 ml	約 250~280 ml
染色液	1 班あたり 200 ml	

Dr.ジーンシリーズ別作製例	MARINE23ST(Wako)	Mupid-2plus ((株)ミューピッド)
ゲル Dr.ジーン 7 (6 班分)	L (12 ウェル) 3 枚/6 班	S (6 ウェル) 6 枚/6 班 または L (12 ウェル) 3 枚/6 班

枚数	Dr.ジーン 8 (6 班分)	L (12 ウェル) 3 枚/6 班	S (6 ウェル) 6 枚/6 班 または L (12 ウェル) 3 枚 /6 班
----	-----------------	--------------------	--

< 試薬の準備 >

本キットを「Dr. ジーン 7」、「Dr. ジーン 8」(6 班構成)と組み合わせて使用する場合、事前に各班で使用する分の試薬を小分けしておくことと実験の進行がスムーズです。

試薬名	小分け分注例	実際の使用量
Gene Ladder Wide 1 キット添付：500 μ l \times 1 本	50 μ l \times 6 班	5~10 μ l/班
6 \times Loading Buffer Orange G キット添付：1 ml \times 1 本	100 μ l \times 6 班	20~40 μ l/班
1 \times TAE 操作 1) で調製：5 L	400 μ l \times 6 班	230~280 ml/班 (泳動槽に注ぐ量)
染色液 操作 3) で調製：1200 ml	200 ml \times 6 班	200 ml/班

※ 小分け分注に使用するマイクロチューブは本品に含まれておりません。

1) 電気泳動バッファー(1×TAE)の調製

手順		注意点
<1×TAE の調製>		
	1×TAE は以降の操作（アガロースゲルの作製、電気泳動、ゲルの染色液調製）で必要なため、まとめて調製します。	
1.	5L の1×TAE を調製する場合、5L 以上の容器を準備します。キット構成品の 50×TAE（100 ml）を容器に全量入れて、次に水を 4,900 ml 加えます。	50×TAE を 50 倍に希釈します。（*1）
2.	スターラーなどで攪拌し、バッファーをよく混合します。	
3.	作ったバッファーは電気泳動用に各班分 400 ml ずつ、試薬瓶かビーカーなどに分けます。 残りのバッファーはアガロースゲルの作製、ゲルの染色液調製に使用します。	必要な 1×TAE の量は電気泳動槽の大きさ、数などによって変わります。（*2）

(*1) 50×TAE とは、電気泳動バッファーTAE の 50 倍濃縮液です。

使用時には 50 倍希釈し、1×TAE に調製し使用します。

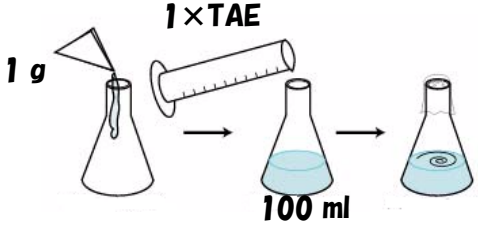
(50×TAE 組成: 2 mol/l Tris-acetate, 50 mmol/l EDTA)

(*2) 本キットには電気泳動装置 MARINE23ST (Wako)などの小型泳動槽を各班で一台ずつ使用することを想定した量の試薬が含まれています。泳動槽の数が少なければ 1×TAE の量は少なくなりますが、MARINE23ST 泳動槽よりも大きな泳動槽を使用する場合には、調製する 1×TAE を多くしなければなりません。

TAE が不足する場合には別途 50×TAE を単品で購入していただく必要があります。

50×TAE (500 ml) : #313-90035 (ニッポンジーン)

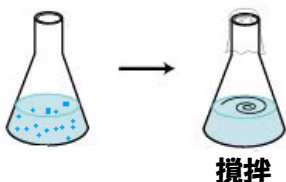
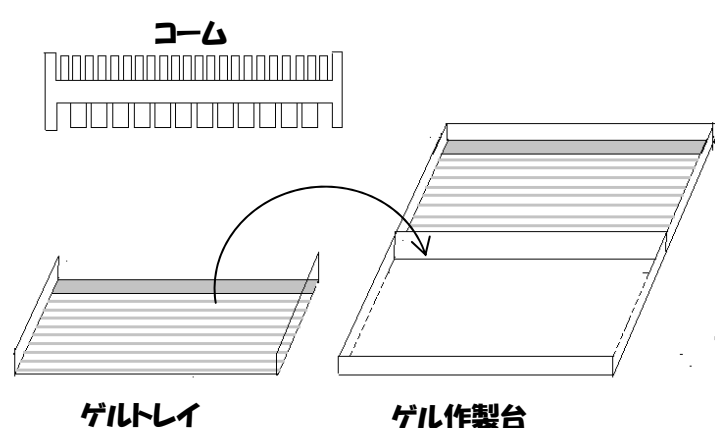
2)アガロースゲルの作製

＜アガロースゲルの作製： 1%アガロースゲル＞	
手順	注意点
<p>ここではMARINE23STに付属しているゲル作製用トレーを使ったアガロースゲル作製方法を示します。異なる泳動槽を使用する場合は、使用する泳動槽のゲル作製方法に従ってください。(*1)</p> <p>1. 以下は<u>ゲル作製用トレー1台で1%アガロースゲル(12 ウェル)を2枚作製する方法</u>です。</p> <p>アガロース(AgaroseS)を1g量り、500 ml程度の三角フラスコにいれます。1×TAEを100 ml加え、三角フラスコをラップで軽くおおいます。針などで<u>何か所か穴を開け</u>、手で回してフラスコを撹拌します。(*3)</p> 	<p>失敗したときのために少し余分にゲルを作製することをおすすめします。</p> <p>1%(W/V)濃度のアガロースゲルを作製します。(*2)</p> <p>Dr.ジーン7では、1.5%のゲルを使用します。アガロース1.5gを量り、1×TAEを100 ml加えます。</p>

(*1) 電気泳動槽 Mupid-2plus (ミューピッド)を使用する場合は、4. 準備・操作＜試薬の分量一覧＞を参考に試薬分量を変更してください。ゲルの作製手順は同じです。

(*2) アガロースゲルは、分離したい目的の DNA の予想される大きさに応じてアガロースの種類や濃度を変えます。今回は一般的に使われている 1% (W/V) 濃度のアガロースゲルを作製する方法を示しています。

(*3) ラップに穴を開けないで密閉してしまうと、電子レンジでゲルを溶かす際にフラスコ内の空気が膨張し、ラップが破裂する恐れがあります。また、フラスコの壁にアガロースの粉末がはりつくると溶けにくくなるため、ゆっくりとフラスコを振り混ぜてください。

<p>2.</p>	<p>三角フラスコを電子レンジに入れ、約5分に時間をセットします。しばらくするとアガロースが沸騰し始め、細かい気泡が出てきます。その時点で一度電子レンジからフラスコを取り出し、よく振り混ぜアガロースを攪拌してください。危険ですので素手で触らないでください。</p>  <p style="text-align: center;">攪拌</p> <p>3.</p> <p>攪拌後、泡が吹き出さないようにフラスコをよく見ながら、さらに1~2分程度電子レンジで溶解します。ときどき取り出し、よく混ぜてください。アガロースの様子を確認し、透明な粒状のものがなくなり、溶液が均一な状態になるまで溶かします。</p> <p>電子レンジから出した後は、<u>50~60°C (手でフラスコを持てる程度)</u>になるまで室温に置いておきます。</p> <p>4.</p> <p>この間にアガロース作製用トレーを組み立てておきます。ゲルトレイをゲル作製台に入れます。</p>  <p style="text-align: center;">ゲルトレイ ゲル作製台</p>	<p>5分間は目安です。</p> <p>アガロースの沸騰による吹きこぼれに注意してください。</p> <p>電子レンジの代わりにガスバーナーによる代用も可能です。 (*4)</p> <p>電子レンジから出した直後の熱い溶解液をゲル作製用トレーへ流し込まないでください。 (*5)</p> <p>水や氷を用いて冷やさないでください。 (*6)</p> <p>コームを差し込んでからアガロースを注ぐ方法と、アガロースを注いでから差し込む方法とあります。どちらの方法でも構いません。</p>
-----------	--	--

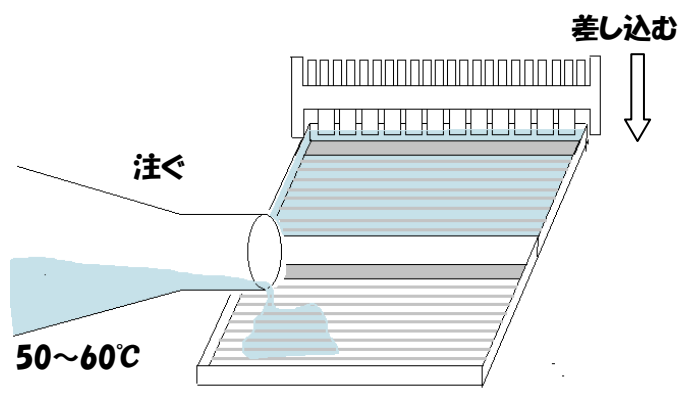
(*4) ガスバーナーを使用する場合：アガロース、1×TAE を添加しガスバーナーで温めます。細かい気泡が出てきたら、ガラス棒などでかき混ぜながら、溶液に透明な粒状のものがなくなり、均一な状態になるまで溶かします。この時、突沸に注意してください。

(*5) 熱によってゲル作製用トレーが変形することがあります。

(*6) ゲルが部分的に固まってしまう恐れがあります。均一でないゲルを使用するとききれいな電気泳動像が得られません。固まってしまった場合は、再度電子レンジで溶かして使用してください。

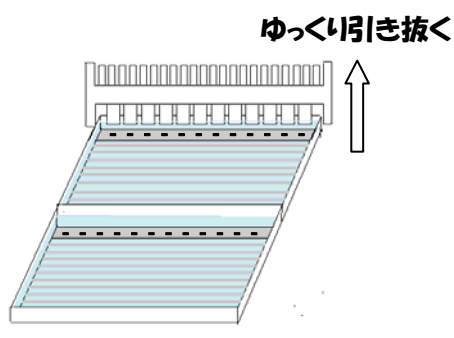
5. アガロースの入ったフラスコが手で持てるくらいの熱さになったら、組み立てておいたゲル作製用トレーにアガロースを注ぎます。ゲル (L) 1枚あたり、約 40 ml (約 0.5~0.8 cm の厚さ) が目安です。

フラスコの中のゲルが固まった場合は、もう一度電子レンジで溶かして使用してください。



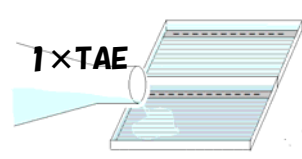
6. ゲルが固まるまで室温に静置し、固まったらコームをゆっくりと抜きます。ゲルはラップなどをして乾燥させないように、使用時まで冷蔵庫で保管します。

コームは慎重に抜いてください。乱雑に扱うとアガロースゲルのウェルが壊れることがあります。



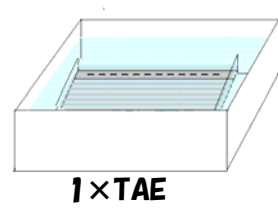
7. ゲルを数日保存する場合は以下の方法で保存してください。
(方法 1)

1×TAE をゲル作製台のゲルの上に注ぎ、ラップをかけて保存します。



ゲルを乾燥させないようにして保存してください。

(方法 2)
ゲルをゲルトレイごとタッパーなどに移し、1×TAE でタッパーを満たし保存します。(タッパーの蓋は閉めてください。)



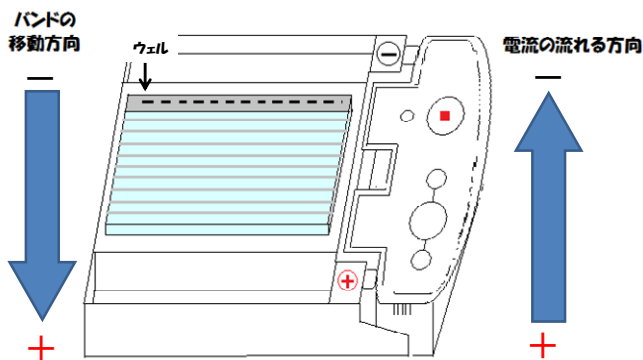
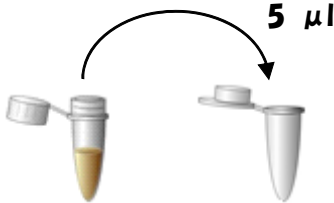
保存の際、他の操作で使用する 1×TAE を使いきらないように注意してください。(*7)

(*7) TAE が不足する場合には別途 50×TAE を購入していただく必要があります。
50×TAE (500 ml) : #313-90035 (ニッポンジーン)

3) 染色液の調製

＜染色液の調製＞10 倍希釈 CLEAR STAIN Blue	
手順	注意点
<p>電気泳動後のゲルを染色するための溶液を調製します。</p> <p>ゲル (L) 1 枚 (1 班) につき染色液 200 ml を使用します。</p> <p>以下では、6 班分の染色液 1,200 ml をまとめて調製する方法を示しています。全量調製しない場合は、染色試薬 CLEAR STAIN Blue を 10 倍希釈してください。</p> <p>1. 染色液用容器に 1×TAE を 1,080 ml 添加し、染色試薬 CLEAR STAIN Blue を全量 (120 ml) 入れます。</p> <p>2. 作った染色液は各班用に 200 ml ずつ試薬瓶等の容器に分けても構いません。室温で保存してください。</p>	<p>衣服等に染色液が付着しないようご注意ください。また、容器に青色の色素が付きます。染色液用容器は、色素が付着してもよいものをご使用ください。</p>

4) 実験操作: 電気泳動

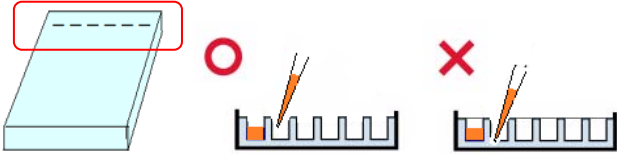
操作	注意点
<p><アガロースゲル電気泳動></p>	
<p>1. あらかじめ作製しておいた泳動用バッファー（1×TAE）を泳動槽に約 230 ml（目安）注ぎ、アガロースゲルをゲルトレイから落ちないように電気泳動槽に置きます。このとき、ゲルが泳動用バッファーに完全に浸かるようにしてください。足りない場合は泳動用バッファーを追加します。<u>ゲルはウェル（コームで作った DNA サンプルを入れるための穴）がある方を一極側にくるようにします。</u>(*1)</p>  <p>2. サンプルの入ったチューブにローディングバッファー 5 μl を加え、ピペティングを数回行い、反応液を混合します>(*2)</p> 	<p>チップはサンプルごとに新しいものを使用してください。</p> <p>ローディングバッファーはサンプル液量に対し、1/4～1/10量添加します。</p>

(*1) アガロースとは、寒天の主要な成分で、主に DNA や RNA の電気泳動に使用されます。寒天の主成分は、アガロース、アガロペクチンと呼ばれる 2 種類の多糖類です。アガロースゲル電気泳動で使用するアガロースは、アガロペクチンを除去したものです。アガロースゲルは網目構造をしており、この構造が「ふるい」の役割をします。長い DNA 断片は網目構造に引っかかりながらゆっくりと移動します。短い DNA 断片は網目構造に引っかかりにくく、長い DNA 断片より早く移動します。

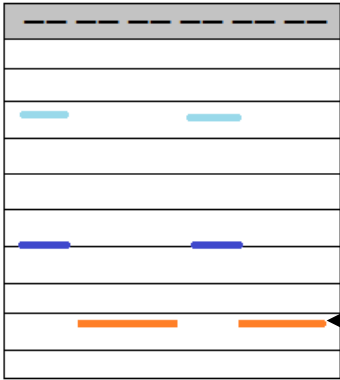
(*2) ローディングバッファー：電気泳動を行う際に 2 つの役割を果たします。

① ローディングバッファーには重しの役割をする比重の重い成分が含まれています。ウェルに DNA サンプルをアプライする際、ローディングバッファーの添加によりサンプルである DNA の比重が重くなりウェル内に沈みます。（ウェル内にサンプルを入れ損なうと、ローディングバッファーを添加しても泳動バッファー中に拡散するので注意してください。）

② ローディングバッファーには色素が添加されており、DNA サンプルがどこまで流れているか予想することができます。

<p>3.</p>	<p>マーカーDNA を 5 μl、サンプルを各 10 μl ずつ順番にゆっくりとゲルのウェルに入れます。</p> 	<p>サンプルは静かにゆっくりウェルに入れてください。(*3) ピペッティングによりチップの洗浄を行う場合は、チップは同じものを使用しても構いません。(*4) ウェルの奥までチップを入れないでください。(*5)</p>
<p>4.</p>	<p>すべてのサンプルをウェルに入れたら、泳動槽に蓋をして電源のスイッチを入れ 100V で約 30~40 分、あるいは 50V で 60 分~90 分程泳動します。泳動時間は使用する電気泳動槽によって異なります。低い電圧で流すと時間はかかりますが、きれいな泳動像が得られます。 <u>電気泳動中は泳動槽のバッファー内に手や指などを入れないでください。感電する恐れがあり危険です。</u></p>	<p>電極の白金線より泡が出ているのを確認してください。(*6) 泳動時間は目安です。ゲル上の色素の位置を確認して、電気泳動を止めてください。</p>

- (*3) マイクロピペットより勢いよく押し出すと泳動バッファー中にサンプルが舞い上がってしまいウェル内にサンプルが入りません。
- (*4) ピペッティングによるチップの洗浄をせずに、チップを新しいものに取り換えても構いません。異なるサンプルが混ざるのを防ぐことが目的です。チップに余裕があれば取り換えてください。チップを取り換えない場合は、1 つのサンプルをウェルに入れた後、泳動バッファー中で数回ピペッティングをし、チップ内を洗った後に、次のサンプルを吸います。
- (*5) 奥まで入れすぎるとチップがアガロースゲルを突き破ってしまい、サンプルがアガロースゲルの裏側から漏れて無くなってしまうことがあります。この場合、このウェルは使用せず別のウェルを使用してください。
- (*6) 電気が流れると白金線より泡が発生します。

＜染色・脱色＞		
<p>5. オレンジ色の色素がゲルの末端（+極側）から 2 cm 程度まできたら、泳動を止め、ゲルをゲルトレイからはずし、染色用容器（タッパーなど）に入れます。</p> <p>ゲルの入った容器に染色液をゲルが浸る程度まで加え、10 分間染色します。染色後、染色液を別の容器に捨て、ゲルを 60℃以下のお湯につけ脱色します。</p> <div style="text-align: center;">  <p style="margin-left: 100px;">オレンジ色の色素がゲルの末端(+極側)から 2 cm 程度まできたら、泳動を止めてください</p> </div>	<p><u>染色方法は以下の表を参考にしてください。</u></p> <p><u>アガロースゲルは壊れやすいので、取り扱いには十分注意してください。</u></p>	
<p>6. すぐに観察しないときはタッパー中または、ラップにくるみ保存してください。デジタルカメラやカラーコピー機でゲルの写真を残すことができます。</p>		

染色方法	染色時間	脱色方法	撮影	保存
染色方法 1	10 分染色液に浸します。(*7)	60℃以下のお湯、または水につけます。 15 分後あたりから目視で確認が可能になります。	2 時間から一晩、常温の水につけておきます。	ゲルをトレイなどのプラスチックケースの上に置き、そのまま一週間程度放置します。ゲルが乾燥し、結果を保存することができます。

(*7) 染色時間は 10 分程度長くなっても構いませんが、脱色時間が長くなります。

5. 廃棄物の処理

実験後のバッファー類の廃棄について

電気泳動バッファー(TAE 廃液)は産業廃棄物として処理してください。

染色液(CLEAR STAIN Blue)は、活性炭に色素を吸着させろ過します。活性炭は可燃物、ろ液(TAE 廃液)は産業廃棄物として処理してください。

アガロースゲルは可燃物として廃棄してください。

製品についてのお問い合わせ先

富士フイルム和光純薬株式会社

フリーダイヤル: 0120-052-099

フリーファックス: 0120-052-806

株式会社ニッポンジーン

TEL: 076-451-6548

FAX: 076-451-6547

ホームページ: <http://www.nippongene.com/siyaku/>