

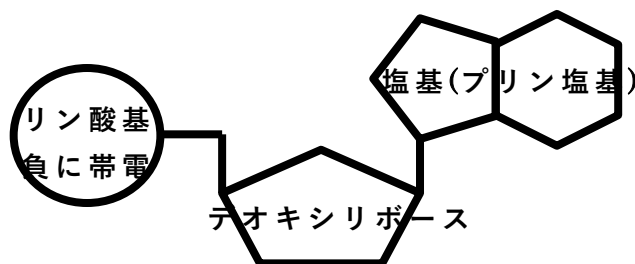
1. はじめに

電気泳動法は DNA や RNA、たんぱく質を分離する手法であり分子生物学や生化学において重要な役割を果たしている。現在は DNA 電気泳動法の支持体としてアガロースゲルを用いる手法が主流であるが他の物質由来のゲルを支持体として用いても DNA 電気泳動法が可能ではないかと考えこの記事執筆した。

2. DNA 電気泳動法の仕組み

荷電している分子を含む溶液または支持体に電圧をかけると、荷電している粒子は自身の荷電とは反対の極に移動する。この時溶液中の高分子または支持体を構成する高分子が荷電している分子の移動を妨げるために分子量が大きい分子ほど移動速度が遅くなる。電気泳動法はこのことを利用し荷電している分子を分子量ごとに分離する技術である。

DNA はデオキシリボースとリン酸基、塩基からなるヌクレオチド(右下図)がホスホジエステル結合で重合した生体高分子である。DNA を構成するヌクレオチドはリン酸



基と塩基が荷電しているが、二本鎖 DNA は相補鎖間で水素結合を形成しており塩基の荷電は打ち消されている。そのため分子全体ではリン酸基のみが荷電しておりその荷電

量は DNA を構成するヌクレオチドの数に比例する。また二本鎖 DNA は鎖状構造であり立体構造が泳動速度に影響を与えないため DNA を構成するヌクレオチドの数のみに依存した泳動パターンが見られる。それに対し RNA や一本鎖 DNA は塩基の荷電が相補鎖によって打ち消さず、また分子内の水素結合によって複雑な立体構造を取りうるため核酸変性剤を加え分子内で二次構造を取ることを防ぐ必要がある。

3. 実験方法

電気泳動法の詳細なプロトコルについては省略し、使用した試薬、装置のみを記す。

(1) 支持体の選択

一部の例外を除き DNA 電気泳動法は支持体を用いる。一般的にはアガロースゲル、短い DNA 断片を泳動する場合はポリアクリルアミドゲ

ルが用いられる。今回提案するものについては後述する。

(2) 試薬の調整

10×TAE(Tris-acetate-EDTA)

①泳動バッファー

一般に TAE バッファーまたは TBE バッファーが用いられるが生物研究部では TAE バッファーを使用している。組成については右図参照。

Tris base	48.4 g
酢酸(acetic acid)	11.4ml
EDTA・2Na(2H ₂ O)	3.7g

②ローディングバッファー

生物研究部ではニッポン・ジーンの Loading Buffer を使用している。

SP 水で合計 1L にする。室温で保存

③核酸染色剤

研究室ではエチジウムブロマイドがよく使用されるが変異原性が指摘されていることも鑑み毒性が低いとされるコスモ・バイオの GelRed を使用している。生物研究部ではあらかじめ GelRed を加える先染めで染色している。

④DNA サイズマーカー

生物研究部ではニッポン・ジーンの Gene Ladder Wide 1(0.1~20kbp) を使用している。

(3) その他

GelRed の検出には UV ランプを用いる。

4. 支持体の候補

(1) アガロース

アガロースとは β -D-ガラクトースと 3,6-アンヒドロ- α -L-ガラクトースが交互に結合した構造を取る多糖であり寒天の主要な成分である。アガロースは融解温度とゲル化温度の差が大きく、中性であり容易に誘導体化されるため酵素や抗原などのタンパク質と容易に結合する。これらの利点から分子生物学・生化学において盛んに利用されている。値段の都合から電気泳動用アガロースではなく市販の食用寒天を使用し 1% アガロース溶液からゲルを作ることを考えている。

(2) コンニャクマンナン

コンニャクマンナンとは β -グルコースと β -マンノースがグリコシド結合により重合した直鎖状の多糖でありコンニャクの主成分である。コンニャクのゲル化は、アルカリ条件下でアセチル基を失った裸状のコンニャクマンナンが分子間の水素結合により部分的に会合し網目構造を形成

すると考えられている。市販のコンニャク粉を使用し 1%コンニャクマンナン水溶液を加熱しその後凝固剤として水酸化カルシウムを加えることでゲル化させる方法を考えている。またコンニャクを成形しそのまま支持体として用いる方法も行いたいと考えている。

(3) キャッサバを由来とするデンプン(タピオカ)

デンプンとは多数の α -グルコース分子がグリコシド結合により重合した天然高分子である。タピオカはデンプンのうちグルコースの直鎖構造からの 1-6 結合による分岐を多く含むアミロペクチンを多く含む。市販のタピオカでん粉を使用しアガロースの場合と同様の方法でゲル化させることを考えている。

(4) コラーゲン

コラーゲンはヒトの体内のタンパク質の約 1/4 を占める主要な構造タンパク質である。コラーゲンは三本の鎖が巻き付いた強固な三重らせん構造を取っている。また多くのタンパク質と同様に熱を加えるとその構造は失われ、周囲の水を吸収しゼラチンとなる。魚の皮に含まれるコラーゲンを精製して得られる乾燥ゼラチンに水を加え加熱により溶解させた 1%の水溶液を冷却することでゲル化させることを考えている。また煮ごりを成形しそのまま支持体として用いる方法も行いたいと考えている。

ポリアクリルアミドに関しては構成単位であるアクリルアミドは毒物及び劇物取締法上の劇物に指定されており今回は使用しない。また、詳細なゲルの作成の方法については後述の論文を参考にする予定である。

5. 支持体としての評価方法

DNA 電気泳動法においては同一条件においては理論上
泳動距離 = 定数 $K * \text{Log}(\text{DNA サイズ}(\text{bp}))$ という式が成り立つことが知られている。そのためマーカーの DNA サイズ(bp)と泳動距離を片対数グラフにプロットし、回帰直線および決定係数を導出することで支持体として優れているかを評価できると考える。またバンドのゆがみやぼやけ等からも支持体として優れているかどうか評価できるだろう。

6. 終わりに

わらび餅を食べているときにこれで電気泳動を行えないだろうかと思ったことが執筆のきっかけである。電気泳動法の歴史は比較的長く今でも盛んに用いられている実験手法である。実際に国立感染症研究所がアップロードしている新型コロナウイルス(正式名称「SARS-CoV-2」)の病原体検出マニュアルにも PCR 産物を解析する方法として電気泳動

法が提示されている。しかし一般に電気泳動法の知名度は低いように思える。興味を持った方は最近何かと名前を聞く PCR だけでなく電気泳動法についてもぜひ調べてほしい。休校の影響もあり実験すら行えず内容の薄い記事だったがここまでお付き合いいただき感謝申し上げます。

7. 参考文献

田村 隆明 遺伝子工学実験ノート 上 DNA 実験の基本をマスターする
羊土社

コスモ・バイオ株式会社 HP(最終閲覧 4/7)

<https://www.cosmobio.co.jp/>

ニッポン・ジーン株式会社 HP(最終閲覧 4/7)

<http://www.nippongene.com/>

Wikipedia アガロース(最終閲覧 4/8)

<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%A2%E3%82%AC%E3%83%AD%E3%83%BC%E3%82%B9>

Wikipedia グルコマンナン(最終閲覧 4/8)

<https://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%B0%E3%83%AB%E3%82%B3%E3%83%9E%E3%83%B3%E3%83%8A%E3%83%B3>

PDBj コラーゲン(最終閲覧 4/5)

<https://pdbj.org/mom/4>

コンニャクマンナンを支持体とする電気泳動法の試み(1987 小笠原 山崎 布村)

サバ皮からのゼラチン抽出法と抽出されたゼラチンの特性(2008 松原) 農畜産業振興機構 HP 植物が創り出すさまざまな「でん粉」の性質(最終閲覧 4/7)

https://www.alic.go.jp/joho-d/joho07_000047.html

Rakuten レシピ 手作りコンニャク(最終閲覧 4/7)

<https://recipe.rakuten.co.jp/search/%E6%89%8B%E4%BD%9C%E3%82%8A%E3%82%B3%E3%83%B3%E3%83%8B%E3%83%A3%E3%82%AF/?s=4&v=0&t=2>

国立感染症研究所 HP(最終閲覧 4/8)

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/>