

Technical Data

## Midori Green XtraのDNA先染め染色における低分子バンド検出感度の改善策

評価製品

FastGene™ Midori Green Xtra (Cat.No. NE-MG10)

目的

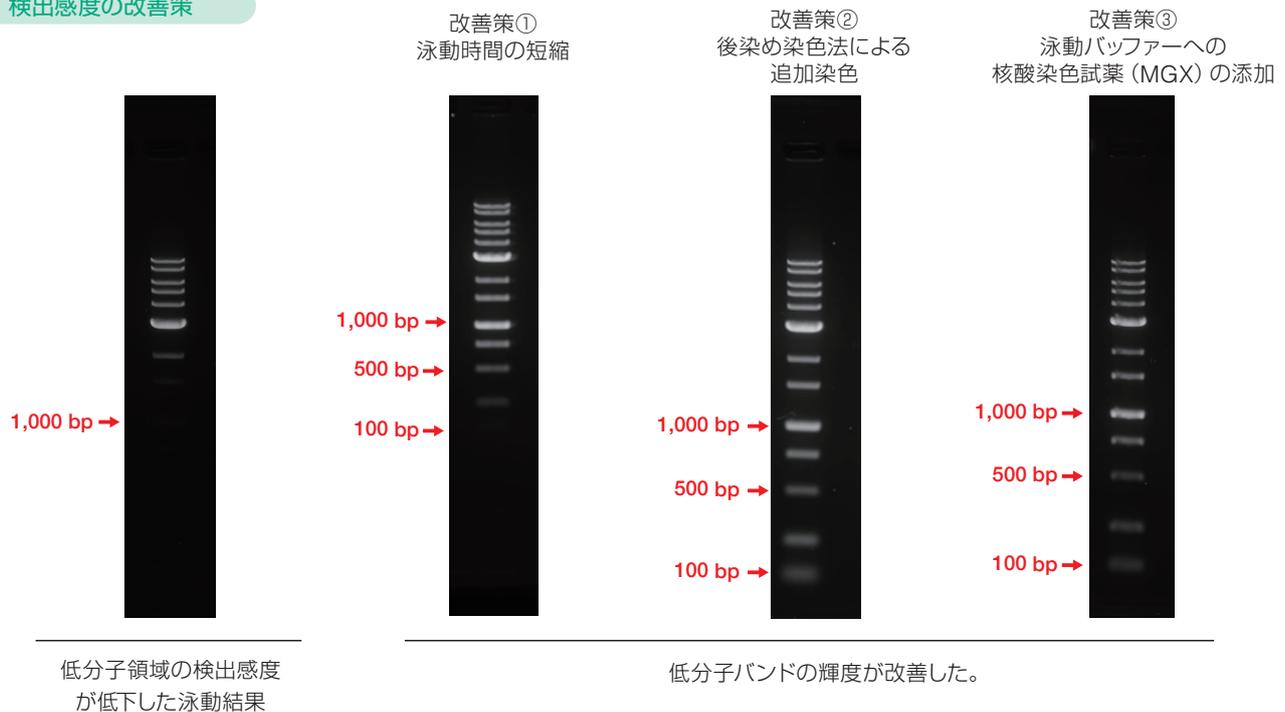
先染め染色法によるアガロースゲル電気泳動を行う際に生じる、低分子領域のバンドの検出感度が低下する現象を改善する。

### 概要

先染め染色法では、使用する核酸染色試薬の種類に関わらず、低分子領域のバンドの検出感度が低下することがあります。本テクニカルノートでは、Midori Green Xtra (MGX) を用いた先染め染色法における、低分子領域のバンドの検出感度を改善する3種類の方法を紹介します。

- ① 泳動時間の短縮
- ② 後染め染色法による追加染色
- ③ 泳動バッファーへの核酸染色試薬 (MGX) の添加

### 検出感度の改善策



### 電気泳動条件

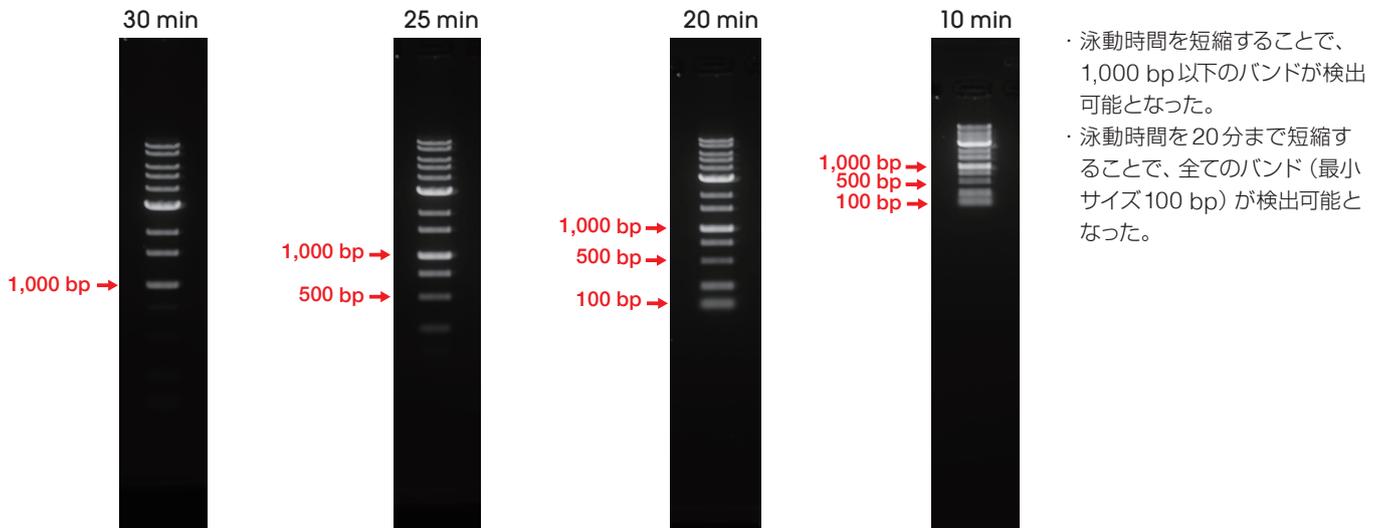
1. 先染め染色用ゲルを以下の条件で作製した。
  - ・アガロースゲル：1% アガロースゲル (20 mL/ミニゲル1枚, Agarose S, ニッポン・ジーン)
  - ・溶媒：1×TAE バッファー
  - ・MGX：4 μL/アガロース 100 mL
2. 1 kb DNA Ladder PLUS (FastGene™, NE-MWD1P) を、1% アガロースゲルに5 μL アプライした。
3. 電気泳動を以下の条件で行った。
  - ・電気泳動装置：Mupid®-exU
  - ・電気泳動条件：100 V, 30 min
  - ・泳動バッファー：1×TAE バッファー 350 mL
4. 泳動後、以下の条件でゲルの画像を取得した。
  - ・撮影装置：FAS-Digi PRO (FastGene™, GP-07LED, GP-07LED/PC, GP-07LED-TAB)
  - ・撮影条件：Illuminator Blue/Green LED (500 nm)  
F=5.6, Exposure=1 sec, ISO 100

## 改善策と結果

## ① 泳動時間の短縮

泳動時間を短縮した結果は下記の通り。

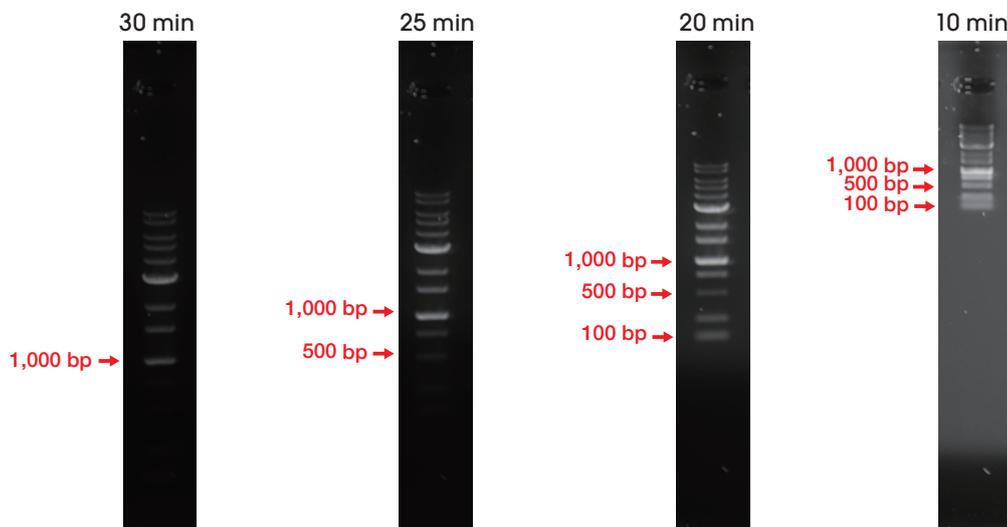
(泳動時間：10, 20, 25, 30 min)



## 〈解説〉

この結果は、先染め染色法における低分子サイズ領域のバンドが見えなくなる原因が、長時間泳動によることを意味している。また、この現象はMGX特有の現象でないことも確認している（参考）。

(参考) FastGene™ Midori Green Advance (Cat. No. NE-MG04) ※MGA使用量1%アガロース100 mLあたりに対し4 μL添加

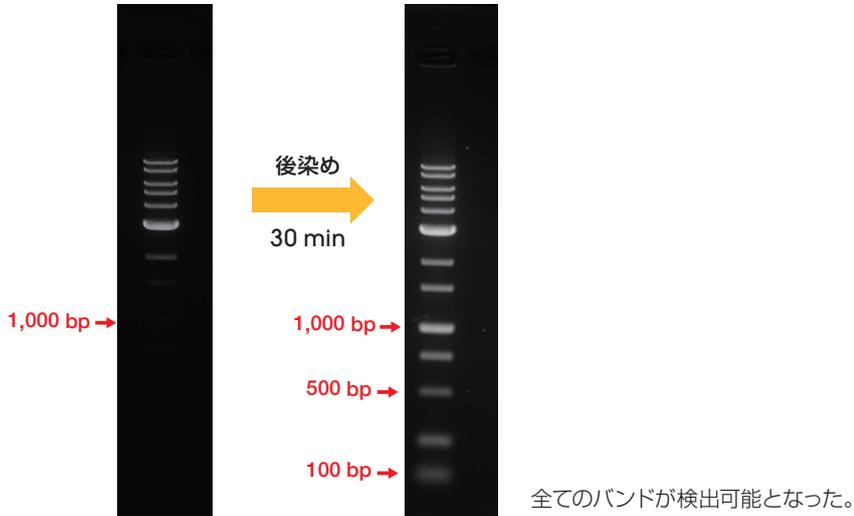


### ② 後染め染色法による追加染色

後染め染色法による追加染色を行った結果は下記の通り。

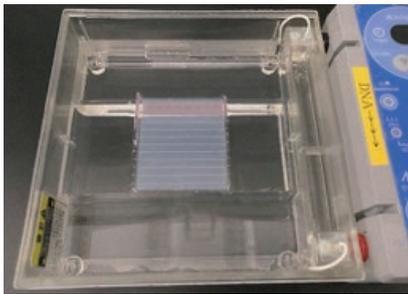
染色溶液：1×TAE バッファー 100 mL に対し、MGX 10  $\mu$ L 添加

染色方法：先染め染色を行ったアガロースゲルを染色溶液に浸し、遮光して30 分間振盪

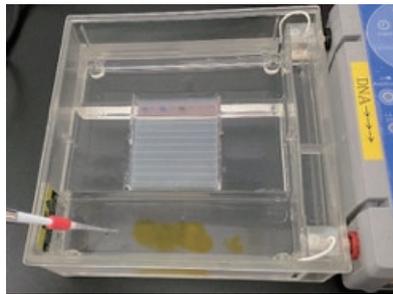


### ③ 泳動バッファーへの核酸染色試薬 (MGX) の添加

以下の手順で泳動バッファーにMGXを添加し、電気泳動を行った。



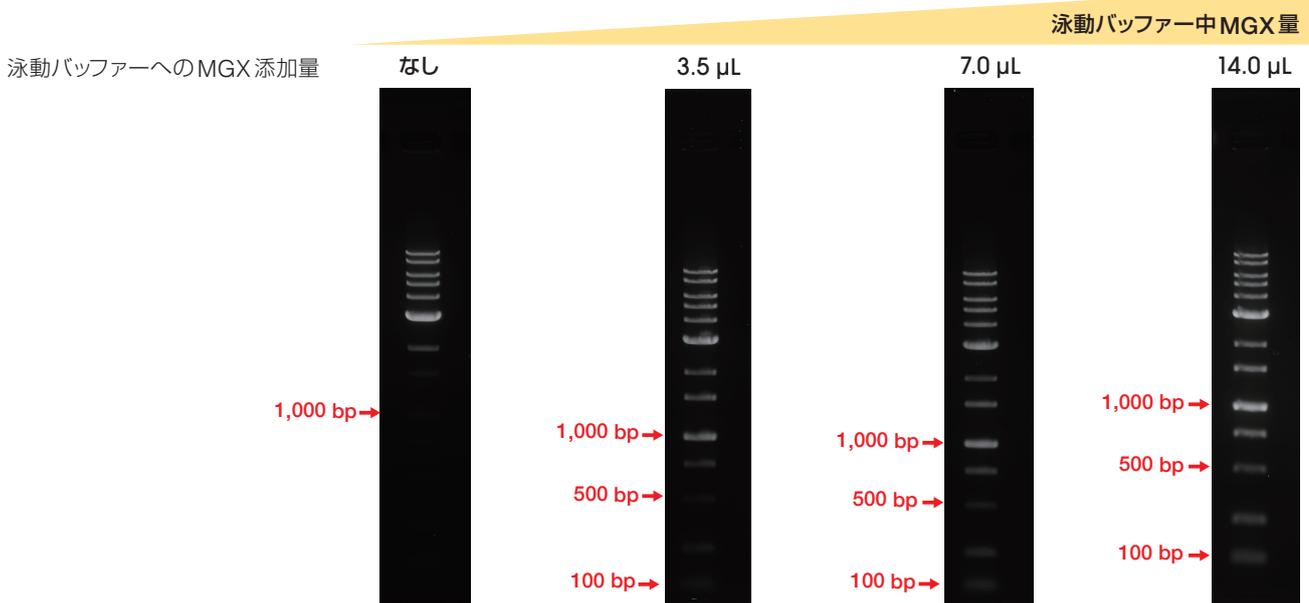
1. 泳動槽に1 x TAE Bufferを350 mL加える



2. 泳動槽のプラス極側にMGXを添加する



3. 泳動槽に蓋をして泳動開始  
※泳動中の遮光なし



泳動バッファーへ添加するMGX量に応じて、1,000 bp以下のバンド輝度に改善が見られた。

## まとめ

本テクニカルノートの通り、先染め染色法において低分子バンド領域の検出感度が下がる現象は、① 泳動時間の短縮 ② 後染め染色法による追加染色 ③ 泳動バッファーへの核酸染色試薬 (MGX) の添加することで解消することができます。また、これらの結果は、検出感度の低下は、ゲルの低分子領域で核酸染色試薬の不足が進んだ結果として起こっていることを示唆しています。

本テクニカルノートに記載した解決方法は、以下にまとめた、それぞれのメリットデメリットを参考に使い分けください。

改善策	使用に適するケース	メリット	デメリット
① 泳動時間の短縮	・ 泳動時間短縮に伴い、バンドの分離能が低くなくても問題ない場合	・ 泳動時間が短くなる ・ MGXの追加が不要である	・ 短縮する泳動時間の調節が必要になる
② 後染め染色法による追加染色	・ 十分なバンドの分離能が求められる場合 ・ 後染め染色を行う時間の余裕がある場合	・ MGX 添加量の調節が不要である (取扱説明書の手順で改善可能) ・ 先染め染色法を行った後で、状況に応じて追加できる	・ 使用する MGX 量が増える* ・ 追加で後染め染色を行う時間が生じる
③ 泳動バッファーへの核酸染色試薬 (MGX) の添加	・ 十分なバンドの分離能が求められる場合 ・ 先染め染色法と同じ時間内で結果を得たい場合	・ 通常の前染め染色法と変わらないバンドの分解能が得られる ・ 追加で行う作業時間が生じない	・ 使用する MGX 量が増える* ・ MGX 添加量の調節が必要になる

\* 【参照】 1回の染色あたりに使用する MGX 量

	① 泳動時間の短縮	② 後染め染色法による追加染色	③ 泳動バッファーへの核酸染色試薬 (MGX) の添加		
ゲル中含有量 (μL/20 mL)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
後染め染色液中添加量 (μL/100 mL)	—	10.0	—	—	—
泳動バッファー中添加量 (μL/350 mL)	—	—	14.0	7.0	3.5
1回の実験で使用する MGX 総量 (μL)	0.8	10.8	14.8	7.8	4.3