

SCIENCE IMAGING SYSTEMS

Application Note No. 3

基礎編：EtBrによるDNA検出

FLA-2000

はじめに

EtBr(エチジウムブロマイド)は、遺伝子解析においてよく使われる蛍光試薬です。SYBR® Green I (Application Note No.2)と同様、dsDNAにインターカレートし蛍光を発するため、電気泳動後のゲル中のDNAを直接染色するのに用いられます。様々な試薬メーカーから入手が可能であり、価格が低いといった点で便利な試薬です。FLA-2000では、473nmレーザー光源を用いてEtBrの蛍光を検出することができます。

EtBrを用いた画像はバックグラウンドが比較的高くなってしまいます。このゲル自身のバックグラウンドを削減するために、FLA-2000では520nmと580nmのフィルタが2種類用意されています。このフィルタを用いると、ゲル自身のバックグラウンドの影響を減らした結果を効率よく得ることができます。

今回のApplication Noteでは、EtBrの基本的な性質、MacBASでの画像反転方法についてご紹介いたします。今後とも皆様のご意見・ご感想をお寄せ頂きますようお願いいたします。

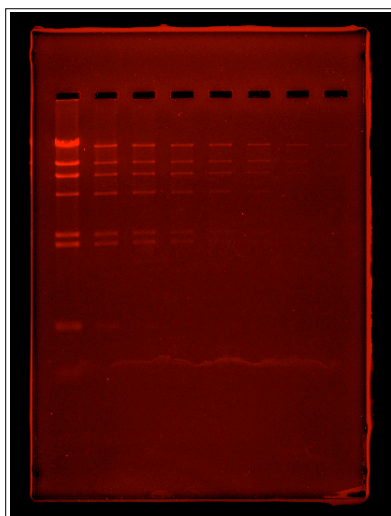
Contents

1. EtBrの基礎データ
2. EtBrの検出感度
3. フィルタの特性
4. MacBASでの解析ワンポイントアドバイス
5. 参考文献

Summary

- ・読み取りフィルタにO580(580nm以下の波長をカット)を用いるとゲルのバックグラウンドの影響が少ない結果を得ることができます。
- ・本文中の実験では、EtBrの検出感度は194pgまで検出することができました。

1 EtBr の基礎データ



画像説明

サンプル： DNA/*Hind* III

アプライ量：

- Lane-1： 1 μg
- Lane-2： 100ng
- Lane-3： 50ng
- Lane-4： 20ng
- Lane-5： 10ng
- Lane-6： 5ng
- Lane-7： 2ng
- Lane-8： 1ng

上記サンプルをアプライし、50V 定電圧で泳動。

FLA-2000 読み取り条件

- Gradation : 65536(16bit)
- Resolution : 50 μm
- Sensitivity : F10
- Latitude : 5
- Sample Mode : Fluor.473nm
:O580Filter

■ 試薬の性質

名称	EtBr (エチジウムブロマイド)
試薬分類	蛍光色素 (インターカレーション型)
特長	DNA・RNA の存在で赤い蛍光を発します。
対象サンプル	dsDNA、ssDNA、RNA
保存状態	遮光した状態で冷蔵庫に入れてください。 水溶液は通常 10mg/ml の濃度に保ってください。
取扱注意事項	DNA にインターカレートするため、変異原性の可能性があります。必ず手袋を着用して使用してください。
製造元	(多数あり)

EtBrの廃棄処理方法

EtBrは変異原性が知られており取り扱いには、白衣、手袋を着用する事は勿論、実験室環境への排出を少なくする事にも注意する必要があります。実験書には、次亜塩素酸ソーダを用いる方法や、活性炭を用いて後処理する方法が紹介されています。

■ 励起・蛍光スペクトル

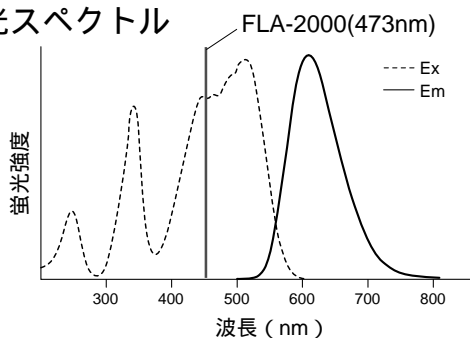


Fig.1-1 励起・蛍光スペクトル

Fig.1-1 DNA 量と蛍光強度の関係

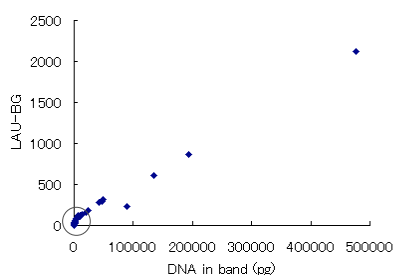


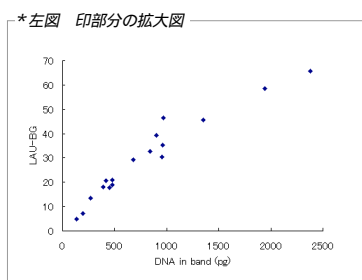
Fig.1-2

Fig.1-2 DNA/*Hind* III の EtBr 染色ゲルの定量性

図左： DNA量と蛍光強度の関係分布図

図右： 左図 印部分の拡大図
FLA-2000用解析ソフトMacBASのプロファイル機能を用いて定量しました。

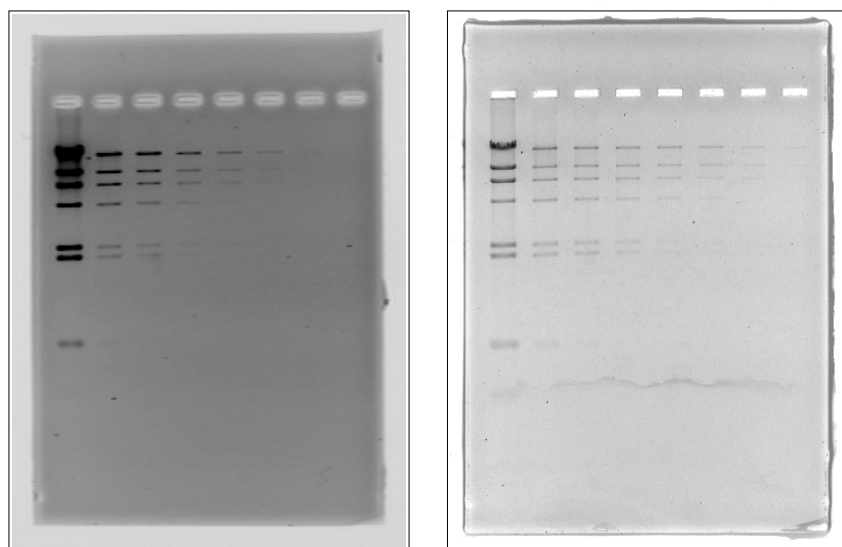
(LAUはFLA-2000の蛍光強度表示単位で、Linear Arbitrary Unitの略です)



2 EtBr の検出感度

EtBrのUVトランスイルミネータ法での検出感度は通常DNA量で1ngといわれています。FLA-2000では、194pgまで検出することができました。

次に挙げるデータは、同一サンプルをUVトランスイルミネータ 312nm励起 と、FLA-2000(473nm励起 / 580nmフィルタ)で比較したものです。



UV トランスイルミネーター FLA-2000
Fig.2-1

Fig.2-1 FLA-2000とUVトランスイルミネーターとの比較
画像 左:UVトランスイルミネーター
画像 右:FLA-2000

DNA/*Hind* IIIをLane1-8に各々1 μ g, 100ng, 50ng, 20ng, 10ng, 5ng, 2ng, 1ng アプライし、電気泳動。1 μ g/mlのEtBrで2時間染色しました。

3 フィルタの特性

FLA-2000では、473nmSHGLレーザーを使用して読み取る場合に、Y520とO580の2種類のフィルタを選択することができます。Y520フィルタは520nm以下の波長をカットし、O580フィルタは580nm以下の波長をカットする特性を持っています。これらのフィルタを使用することにより、ノイズとなる成分をカットし、より感度の高い結果を得ることが可能になります。

下図が示すとおり、ゲル自身にもバックグラウンドがあります。EtBrの場合、O580フィルタを用いると、Y520フィルタを用いたときより先ゲルのバックグラウンドを減らすことができます。

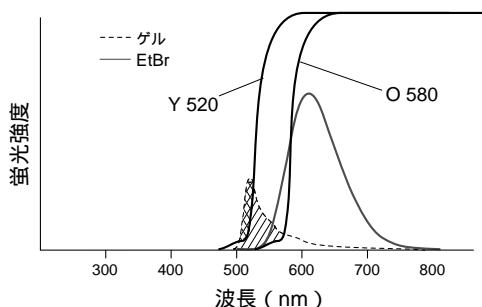


Fig.3-1

Fig.3-1 EtBrの蛍光スペクトルとフィルタの関係

4 MacBAS での解析 ワンポイント・アドバイス

Q2. FLA-2000 で EtBr のサンプルを読み取りましたが、FLUOR ステージにサンプルをのせる際間違えてしまい、画像の表裏が逆になってしまいました。どうしたらよいでしょうか？

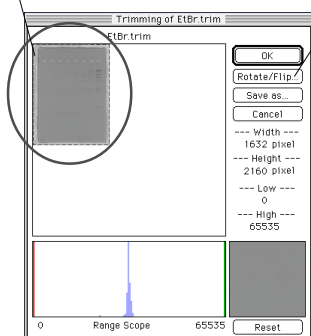
A2. MacBAS では読み取り後画像を開く際^{*1}、画像が表裏逆であることに気付いたらその場で簡単に画像を反転させることができます。反転後の画像は、Trimming of... ダイアログ上で確認してから OK ボタンで確定させます。

解析の流れ

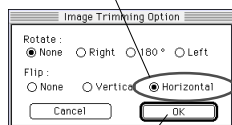
- ・ 画像を開く
- ・ 画像を見やすくする
- ・ 定量する
- ・ プリントする
- ・ 他のアプリケーションで活用する
- ・ データを保存する
- ・ 終了させる

読み取り後、画像が反転しているかどうかは、この画像のプレビューで確認してみると分かります

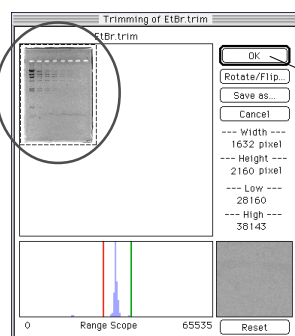
反転させるときはここをクリック



これを選択することにより画像を水平方向に反転させることができます

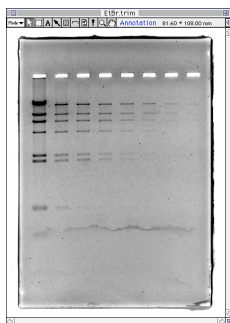


クリックして確定させます



^{*1} File Trim Again... で反転させたい画像を選び、設定することにより、一度 Save した画像に対しても行うことができます。

プレビュー画像で反転したことを確認したら、ここをクリックして画像を開きます



反転された画像が表示されます^{*2}

^{*2} 反転させた画像は、この段階では Save されていません。File Save.. で保存するか、画像を閉じる際に「Save this file before closing?」と表示されたダイアログ上で Yes のボタンをクリックしデータを保存してください。

5 参考文献

- (1) Waring, M.J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids, *J. Mol. Biol.* 13:269-282 (1965).
- (2) Sharp, P. A., Sugden, B., Sambrook, J. Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using agarose-ethidium bromide electrophoresis, *Biochemistry* 12:3055-3063 (1973).
- (3) Lunn, G., Sansone, E. B. Ethidium bromide: Destruction and decontamination of solutions, *Anal. Biochem.* 162:453-458 (1987).
- (4) Menozzi, F. D., Michel, A., Pora, H., Miller, A. O. A. Absorption method for rapid decontamination of solutions of ethidium bromide and propidium iodide, *Chromatographia* 29:167-169 (1990).
- (5) Grundemann, D., Koepsell, H. Ethidium bromide staining during denaturation with glyoxal for sensitive detection of RNA in agarose gel electrophoresis, *Anal. Biochem.* 216:459-461 (1994).
- (6) Dutton, M. D., Varhol, R. J., Dixon, D. G. Technical consideration for the use of ethidium bromide in the quantitative analysis of nucleic acids, *Anal. Biochem.*, 230, 353-355 (1995).

著者・編集

三浦 研二

土谷 徹

長島 真喜子

今井 千織

(富士写真フィルム)

1998年 3月発行



富士写真フィルム株式会社

●本書についてのお問い合わせは

東京本社 ■ 機器事業部 サイエンス・システム

〒106-8620 東京都港区西麻布2-26-30 TEL (03)3406-2201

FAX (03)3406-2158

E-mail : sginfo@tokyo.fujifilm.co.jp