SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No. B117

MCE

MultiNA™を用いた環状プラスミド DNA の検出

遺伝子組み換え実験においては、さまざまなプラスミドが用いられています。近年ではその利便性の良さからバイオリソースの保存や分配にも利用されています。プラスミドの純度やサイズを測定する場合には、従来、アガロースゲル電気泳動法が用いられています。プラスミドは同じ配列でも立体構造が異なる状態で存在することがあり、これは電気泳動の際に分子篩を通過するときの移動度に影響します。立体構造が異なる状態とはスーパーコイル（super coil）、オープンサーキュラー（open circular）、リニア（linear）の三形態です（図 1）。スーパーコイルは二本鎖 DNA に切れ目が無い状態で、輪ゴムがきつくよじれたような状態です。オープンサーキュラーは、二本鎖 DNA のどちらか一方の鎖に切れ目（ニック）が入って、よじれがほどけた円の状態です。リニアは、二本鎖 DNA のどこかの部分の 2 本の鎖が完全に切れて、直鎖になった状態です。これらの三形態はそれぞれ“みかけ”のサイズが異なります。そのため、同じサイズのプラスミドをアガロースゲル電気泳動した場合、検出されるサイズは三形態で異なる場合があります。

現在では従来のアガロースゲル電気泳動に代わる手法としてマイクロチップを使用する電気泳動装置が普及してきました。中でも当社のマイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA はアガロースゲル電気泳動の作業過程をすべて自動で行える装置です。

ここでは 3 種類のプラスミドの分析をマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA で分析した場合とアガロースゲル電気泳動で分析した場合の実例について紹介いたします。

Y. Sogabe

マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA™

■試料と方法

分析試料として pGEM-3zf (+) Vector（3197 bp）（Promega 社製 P227A）、M13mp18RF（7249 bp）（タカラバイオ社製 3118）、pUC19（2686 bp）（タカラバイオ社製 3219）の 3 つのサイズの異なるプラスミド DNA を用いました。

3 種のプラスミド DNA のマルチクローニングサイト上に共通にある制限酵素切断サイト（EcoR I）を利用して直鎖（リニア）状のプラスミドを調製しました。

環状および直鎖状にしたプラスミドは MultiNA とアガロースゲル電気泳動による分析を行いました（図 2）。

MultiNA での分析には DNA-12000 キットを用いました。アガロースゲル電気泳動は 0.7 %のアガロースゲルを作成し、核酸の検出にはエチジウムブロマイドによる染色を行いました。

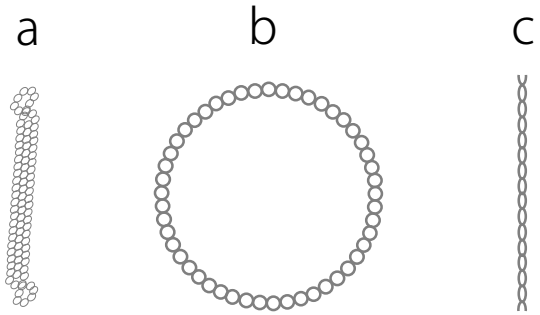

図 1　プラスミドの三形態
a：スーパーコイル、b：オープンサーキュラー、c：リニア

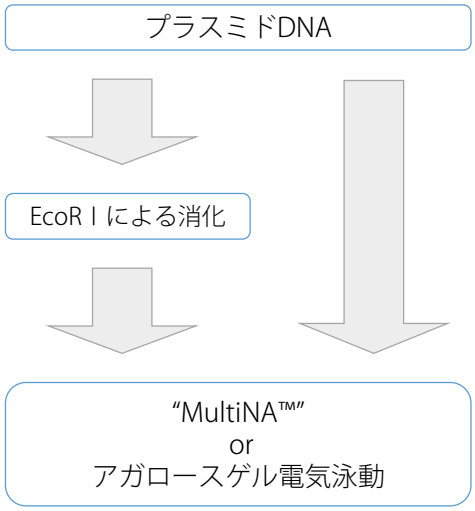

図 2　分析プロトコル

■結果

MultiNA による電気泳動では明瞭な分析結果（ゲルイメージ）を得ることができました図 3（a1、a2）。

環状プラスミドの分析では 3 種はそれぞれ pGEM-3zf (+)（約 1100 bp）、M13mp18RF（約 1750 bp）、pUC19（約 950 bp）に検出されました図 3（a1）。これらはいずれにおいても理論値よりも約 1/3 小さいサイズに検出されたことになります。これらはプラスミドがスーパーコイルの状態で検出されたものと推察されます。また、制限酵素処理を行い直鎖状プラスミドの分析ではそれぞれ理論サイズの位置に検出されました図 3（a2）。

アガロースゲル電気泳動でも同様のサンプルを分析してゲル画像を得ることができました図 3（b1、b2）。MultiNA との感度の差を考慮して 10 倍量をアプライしました。

環状のままの分析では理論サイズよりも約 1000 bp から 2000 bp くらい小さいサイズと理論値に近いサイズにも検出されました図 3（b1）。理論値に近いサイズはかなり薄い状態でした。

制限酵素処理で直鎖状にしたプラスミドの分析では MultiNA と同様に理論サイズに近いサイズが検出されました図 3（b2）。残念ながらアガロースゲル電気泳動ではラダーマーカからかなり大まかなサイズしか推定することができません。さらに、電気泳動写真からもあまり明瞭な結果とは言い難い結果となりました。

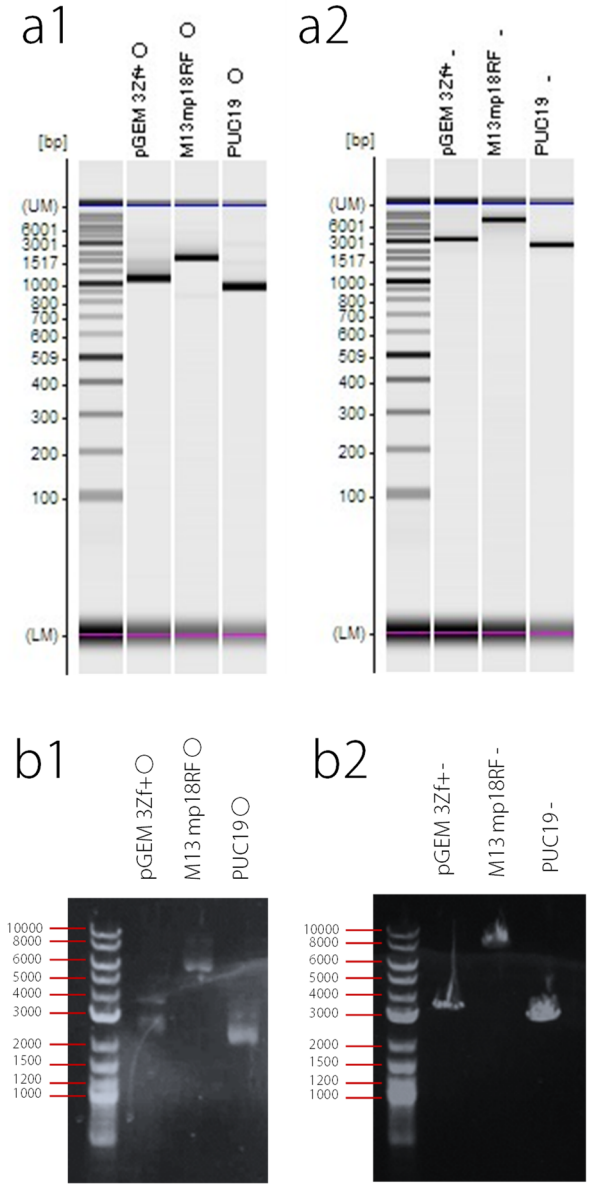

図 3　電気泳動の分析結果
a：MultiNA のゲルイメージ
（a1：環状プラスミドの分析、a2：直鎖状プラスミドの分析）
b：0.7 %アガロースゲル電気泳動
（b1：環状プラスミドの分析、b2：直鎖状プラスミドの分析）

■まとめ

MultiNA によるプラスミド分析の特徴として、①プラスミドをそのまま分析すると、スーパーコイルの状態で通常よりも約 1/3 ほどの小さいサイズで検出されます、②制限酵素処理などで直鎖状にすることにより、本来のサイズで検出されます。環状での分析において MultiNA とアガロースゲル電気泳動にて違いがみられたのは両者における分離媒体の網目構造の違いによるものではないかと推察されます。

本事例のように MultiNA でプラスミドのサイズ分析する場合には制限酵素により直鎖状にすると、正味のサイズ結果を得ることができます。また、MultiNA での分析はアガロースゲル電気泳動のエチジウムブロマイド染色と比較しておよそ一桁感度が高いので、確認に用いるサンプル消費を最小限に抑えることができます。

MultiNA の自動分析はサンプルと試薬をセットするだけで分析中の手間がかかりません。特に多検体処理が必要な場合には業務効率を大きく改善することができます。

MultiNA は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。
pGEM は、Promega Corporation の米国およびその他の国における商標または登録商標です。
その他、本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

株式会社 島津製作所　分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター
島津コールセンター　0120-131691
(075) 813-1691

初版発行：2020 年 9 月

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。
https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。
https://solutions.shimadzu.co.jp/
会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。