

エタノール沈殿あれこれ

春木 満

バイオ実験において、エタノール沈殿（エタ沈）は、最もよく行う操作のひとつといってもよいであろう。塩とエタノールを加えて遠心機にかけるだけ、というきわめて単純な作業なので、原理などもあまり気にかけないで行いがちと思われる。しかし、よく考えてみると、通常使用する塩は酢酸ナトリウムであるが、酢酸アンモニウムを使うことがあったり、またエタノールではなくイソプロパノールを使ったりと、意外と奥が深く、さまざまなバリエーションがあることに気づかされる。その理由を聞かれると、意外と知らないことも多いのではないだろうか。核酸の種類や混入物の種類に応じて、最適な方法を選択する必要がある。そこで、このような原理を知っておくと、何か間違ったりした場合にも臨機応変な対処が可能となる。本稿がそのようなところでお役に立てれば幸いである。

エタノール沈殿の歴史¹⁾

エタノール沈殿そのものは、古くからDNAを研究する有機化学者によって、DNA精製法として用いられていたということである。しかしながら、初めて生命科学の研究に応用したのは、ロックフェラー大学のAveryの研究室にいたAllowayであった。Allowayは、R型肺炎双球菌からの抽出物によるS型肺炎双球菌の形質転換に成功したが、安定的には再現できなかった。そして、肺炎双球菌からの抽出物を、エタノール沈殿を用いて濃縮することにより、これを解決した(1933年)。この成果が、後にAveryが行った、DNAが遺伝物質であることを示す有名な研究(1944年)につながってゆくのである。

エタノール沈殿の原理¹⁾

DNAは負に帯電したリン酸骨格を持ち、水溶液中で親水性コロイドとして存在している。エタノールなどの水溶性の有機溶媒を加えると水和水が奪われる。しかしながら、それだけではリン酸基の負電荷による反発のため、凝集することができない。塩を加えると、リン酸基の負電荷間の反発が解消され、ファンデルワールス力が優勢となり、DNA鎖同士が凝集して沈殿する(コロイドの塩析)。

エタノール沈殿に影響を与える要因

通常、DNAを含む溶液に適当な塩を加え、それに2~3倍量のエタノールを加えた後、遠心分離して沈殿させるのであるが、その回収率に影響を与える要因を以下に示す。

(1) 温度

かつてのプロトコールでは、 -70°C で30分程度冷却すると指示されていたが、現在では室温でもまったく問題ないことがわかっている²⁾。それどころか、低温にすると粘度が高くなるため、DNAが凝集しにくくなって、かえって回収率が落ちしまう²⁾。

(2) DNA濃度

2.4 ng/ml~0.4 $\mu\text{g/ml}$ の範囲では、ほとんど回収率に差が見られないが、4 $\mu\text{g/ml}$ ではかなり回収率が上昇し、40 $\mu\text{g/ml}$ ではほぼ100%の回収率となる(図1)³⁾。

(3) 沈殿させる時間

塩とエタノールを加えた直後と10分後で、回収率は数%程度しか変わらない^{2,3)}。一方、低DNA濃度の場合には、一晩おくことによって、かなり回収率が向上する²⁾。

(4) 遠心分離の時間

高DNA濃度の場合には16,000 $\times g$ で15分程度の短い時間でほとんどのDNAが回収できるが、低DNA濃度の場合には時間が長くなるにつれ、顕著に回収率が向上す

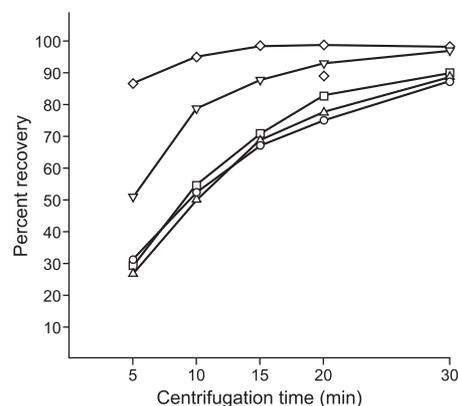


図1. DNAのエタノール沈殿に対する遠心分離時間の影響。○, 0.6 ng; △, 10 ng; □, 100 ng; ▽, 1 μg ; ◇, 10 μg (文献3より許可を受けて転載)。

る(図1)³⁾。30分間遠心分離すれば、80%以上の回収率となる。

(5) 溶液量

溶液量が多くなると、凝集したDNAが遠心分離によりチューブの底に到達するのに長い時間を要する。したがって、溶液量が少ないほうが回収率がよく、遠心分離の時間も短くてすむ²⁾。

エタノール沈殿に用いられる塩の種類

(1) 酢酸ナトリウム

最も一般的に用いられ、通常3 M酢酸ナトリウム(pH 5.2)を最終濃度0.3 Mとなるように加える。pH 5.2はRNA用で、DNA用には中性のものを使用するというマニュアルも存在するが、DNAでもpH 5.2で特に支障はない。

(2) 酢酸アンモニウム

dNTPや糖類の共沈を軽減する目的で用いられる¹⁾。しかしながら、酢酸ナトリウムを使用した場合に比べて、酢酸アンモニウムを使用した場合には、dNTPの共沈は若干減少するようであるが、どちらの場合も2回エタ沈を繰り返すと、ほとんどdNTPは除去できるそうである²⁾。また、酢酸アンモニウムはタンパク質を除去するのにも有効であると報告されている²⁾。タンパク質を含むDNA溶液に最終濃度2.5 Mになるように酢酸アンモニウムを加えて22°Cで0~30分放置後、16,000 × gで15分間遠心分離すると、90%以上のタンパク質が沈殿する。次に、その上清に2~3倍量のエタノールを加えて遠心分離すると、沈殿したDNAにはほとんどタンパク質は含まれないという。なお、アンモニウムイオンはT4ポリヌクレオチドキナーゼ、DNAリガーゼ、一部の制限酵素の活性を阻害するので、これらの反応を行う場合には適さない⁴⁾。

(3) 塩化リチウム

RNAは2'水酸基の存在により親水性が高く、沈殿させるのにより高濃度エタノール(2.5~3倍量)を必要とする。塩化リチウムはエタノールに対して溶解性が高く、共沈することがないため、RNAのエタ沈に適している¹⁾。ただし、塩化物イオンは逆転写反応を阻害するため、このような用途に使用する場合は、リンスを丹念に行って十分に塩を除去する必要がある。塩化リチウムはこのほか、高分子量のRNAを選択的に沈殿させるのに用いられている。塩化リチウム(最終濃度2~3 M)を加えて(エタノールは加えずに)、氷上で2時間以上インキュベートしたのち遠心分離すると、tRNAや5S RNAなどの低分子量RNAやDNA、多糖類、タンパク質は

沈殿せずに上清に残るため除去できる¹⁾。

(4) 塩化ナトリウム

DNA溶液にSDSが含まれている場合には、SDSの析出を防ぐために、塩化ナトリウム(最終濃度0.2 M)を使用する必要がある¹⁾。特に、SDSのカリウム塩は難溶性となる。pHメーターの電極液にKClが使われており、SDSはpHを合わせてから加えなければならない、と最初にpHメーターを使用する時に習ったことが思いだされる。アルカリミニプレップ法によるプラスミド抽出では、これを逆手にとって、SDSを沈殿させて除去するために酢酸カリウムが用いられている。

(5) 塩化マグネシウム

塩化マグネシウムを最終濃度0.01 Mとなるように加えた溶液に、等量のエタノールを加えることにより、7塩基以上の核酸を沈殿させることができる⁵⁾。そのため、通常のエタ沈においても、100塩基以下の短いDNAの場合は、塩化マグネシウムを最終濃度0.01 Mとなるように加え、一時間以上放置することが推奨されている¹⁾。ただし、この場合にはdNTPも沈殿してしまうようである。ダイターミネーターを用いたDNAサイクルシーケンス法において、反応後に行うエタ沈でEDTAを加えるのは、マグネシウムをキレートして、未反応のダイターミネーターが沈殿するのを防ぐためと思われる。塩化マグネシウムのみを加えたエタ沈では、dNTPの沈殿が防げるので⁵⁾、エタノールのみを加えてエタ沈する方法も提示されている⁶⁾。

キャリアによる共沈

前述したように、DNAが微量であってもエタ沈によって沈殿は生じる。しかしながら、その沈殿は目視により確認できず、誤って上清とともに捨ててしまいかねない。また、微量の場合、回収率を高めるためには、沈殿させる時間や遠心分離の時間を長くする必要がある。以上の難点を解消するために、エタ沈によりDNAと共沈する物質を添加することがよく行われる。そのうちtRNAは安価であるが、リン酸化など以降の反応に影響する場合には適していない¹⁾。グリコーゲンなどの多糖類やポリアクリルアミドはエタ沈により沈殿し、各種酵素反応も阻害しないので、よく用いられている^{1,7)}。ただし、グリコーゲンは、タンパク質とDNAの相互作用を阻害することが知られている^{1,7)}。また、グリコーゲンが存在すると、形質転換の効率は大きく低下するということがある⁸⁾。ポリアクリルアミドを用いた場合、8 bp以下の短いDNAは沈殿しないのでdNTPの除去も可能である⁷⁾。ちなみに、沈殿が目に見えるようになっても、半分近く

はマイクロチューブの遠心力方向の壁面に薄く広がっているため、回収率を上げるためには、溶解する液をその部分に十分に接触させる必要がある¹⁾。

イソプロパノール沈殿^{1,4)}

イソプロパノールはエタノールより疎水性が高いため、核酸の溶解度が低く、より少ない量で核酸を沈殿させることができる。核酸溶液と等量のイソプロパノールを加えればよいので、遠心分離する液量が少なく済むという利点がある。しかしながら、イソプロパノールはエタノールより揮発しにくいいため、乾燥に時間がかかる。また、イソプロパノールが残ると、以後の酵素反応などに影響を与えるので、十分に除去する必要がある。

PEG 沈殿

ポリエチレングリコール (PEG) は親水性のポリエーテルであり、アルコールと同様に水和水を奪う効果があるので、DNAを沈殿させることができる。RNAはDNAより親水性が高いため凝集しにくい。このため、プラスミドなどの精製過程でRNAを除去することができる⁴⁾。PEG8000を6.5%、NaClを0.8 Mとなるように加え、4°Cで1時間冷却したのち、遠心分離により沈殿させる。PEGを除くために70%エタノールでリンスを行う必要がある。また、短いDNAも沈殿しないので、PCR後にプライマーを除去することができる⁹⁾。たとえばPEG8000を10%、MgCl₂を10 mMとなるように加え、ただちに室温で10分間遠心分離すると100 bp以下のフラグメントは沈殿しない。

エタノール沈殿とタンパク質変性

制限酵素反応後、エタ沈を行うことにより、多くの制限酵素は失活させることができる¹⁰⁾。このような失活は、エタノールのタンパク質変性作用によるものと考えられる。異なった反応条件の制限酵素でダブルダイジェスチョンする場合、1番目の制限酵素で切断後、エタ沈で失活させることができれば、そのまま2番目の制限酵素による反応を行うことができる。しかしながら、エタ沈で失活しない制限酵素もあり、2番目の制限酵素の反応条件でスター活性を示す恐れがある。このような場合、熱処理やフェノール処理を行うことにより、完全に失活させる必要がある。

タンパク質変性作用は、エタノールの消毒効果の主要因の一つである考えられている¹¹⁾。この消毒効果は、70%エタノールが最も高いといわれている。ところで、エタ沈のリンスも70%エタノールが用いられるが、何か関連があるのだろうか。実は消毒用エタノールは70%(wt/wt)であり、エタ沈用は70%(v/v)である。70%(wt/wt)は77%(v/v)に相当する。この付近のエタノール濃度において、タンパク質が最も変性しやすいために、高い消毒効果を示すということである¹¹⁾。エタ沈用の70%(v/v)は、DNAが溶解せず、塩も析出しないという条件であるから、消毒用エタノールの濃度とは無関係であるが、制限酵素が失活しやすいという点で関連があるといえなくもない。

おわりに

本稿を執筆するにあたり、いろいろと調べてみたところ、恥ずかしながらよく知らなかったことも多かった。最善の方法を選択し、実験を円滑に進めるためには、原理や手法についてよく習熟しておく必要があることが、改めて痛感された。本稿で触れた以外にも多数の工夫がなされており、Web上で公開されているので、必要に応じてこれらも参考にされたい。

文 献

- 1) Sambrook, J. and Russell, D. W. : *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., A8.12 (2001).
- 2) Crouse, J. and Amorese, D.: *Focus*, **9** (2), 3 (1987).
- 3) Zeugin, J. A. and Hartley, J. L.: *Focus*, **7** (4), 1 (1985).
- 4) 中山広樹, 西方敬人: バイオ実験イラストレイテッド1 分子生物学実験の基礎, p.116, 秀潤社 (1995).
- 5) Ruzzell, W. E.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 3053 (1963).
- 6) http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040995.pdf
- 7) Gaillard, C. and Strauss, F.: *Nucleic Acids Res.*, **18**, 378 (1990).
- 8) <http://www.nippongene.com/pages/products/extraction/emate/etmt02.html>
- 9) Hartley, J. L. and Bowen, H.: *Focus*, **18** (1), 27 (1996).
- 10) 制限酵素メーカー各社のカタログに記載
- 11) Ali, Y. et al.: *Disinfection, Sterilization, and Preservation* (Block, S. S. ed.), p.229, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania (2001).

※2), 3), 9) はかつてBRL社が発行していた技術雑誌であり、インビトロジェン社のHPからダウンロード可能。
(<http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf/focus.html>).