

アガロースゲルからのDNA抽出

加藤 純一

アガロースゲル電気泳動はきわめて簡便で効果的なDNAのサイズ分画法である。したがって、特定のDNA断片のサブクロニングや標識、特定サイズのゲノムライブラリー構築の前工程として欠かせない。しかし、クロニングや標識に供するためには当然ながらアガロースゲルからDNA断片を抽出する必要がある。そのためか、アガロースゲルからのDNA抽出の方法は古くから検討されて複数の方法が開発され、利用されてきた。現在はGENECLEAN KITによるDNA抽出が標準的な手法となっている。では、それ以前のDNA抽出法にはどんなものがあったか？手元にある昔の実験書を紐解いたところ、1984年発行の文献1に一挙掲載されていた。まず、1981年の卒業論文研究以降、10年近く筆者がお世話になった手法である。それらについて紹介する。

電気溶出法

DNAのアガロースゲル電気泳動は、負の電荷を持つDNAが陽極に移動することとアガロースゲルの篩効果を利用した分画方法である。ならば、ゲル中のDNAも電気泳動に供すればゲルから抽出することができよう。これはきわめて単純で自然な発想であることから、おそらく電気溶出法は最初に考案されたDNA抽出法ではないかと思う。文献1のリストでも1番目に紹介されていた。

まず、目的のDNAのバンドを含むゲルを切り出し、そのゲル断片を少量の電気泳動バッファーとともに滅菌

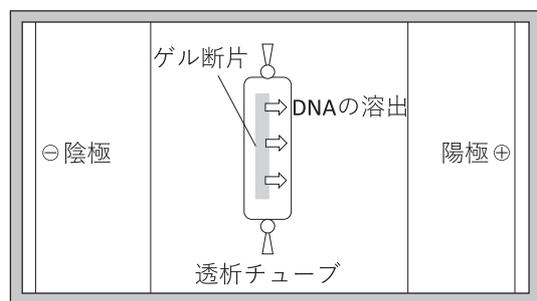
した透析チューブに入れ封をする。この透析チューブをサブマリンタイプの電気泳動槽に入れて一定時間電気泳動を行い、DNAを電気溶出させる(図1)。その後、透析チューブに「へばりついた」DNAをはがすため、陰極と陽極を逆転させ電気泳動を行う。1~2分間ほど電気泳動した後透析チューブから電気泳動バッファーを回収する。回収した電気泳動バッファー中のDNA濃度は非常に低いので2-ブタノール抽出を繰り返して水分を有機相の方に抽出することで濃縮を行う。当時(1980年代)、容易に水分を抽出するためにニッポンジーンから「みずぶとりくん」というブランド名の吸水ポリマーが販売されていたことを思い出す。濃縮した電気泳動バッファーをエタノール沈殿に供しDNAを回収する。

低融点アガロースゲル法

65°Cの低融点のアガロースゲルを用いて電気泳動を行い、DNAをサイズ分画する。この時、ゲルが高温になると溶解してしまうので、低温室で電気泳動を行うなど温度管理が必要である。電気泳動後、目的のDNA断片を含むゲル領域を切り出す。65°Cでゲル断片を溶解させた後、すぐに等量のフェノールを添加してフェノール処理を行い(アガロースの除去)、水相を回収する。この操作をさらに2回繰り返した後エタノール沈殿でDNAを回収する。筆者が学生のころ、低融点アガロースは高価であったので、もっぱら電気溶出法が使用されていたように思う。

DEAEろ紙法

文献1を読んで初めて知った画期的なDNA抽出法である。DNAは負の電荷を持つポリマーなので、陽イオン交換のDEAEろ紙に吸着する。その吸着能を活用したのがDEAEろ紙法である。まず、通常通りアガロースゲル電気泳動でサイズ分画を行う。ゲルをエチジウムブロミド染色した後UV照射下でDNAバンドを確認し、目的のバンドの少し下側(陽極側)に切れ込みを入れる。その切れ込みに適当なサイズに切ったDEAEろ紙の断片を挿入し、再び電気泳動を行い、目的DNAバンドをDEAEろ紙に吸着させる(図2)。DEAEろ紙に吸着した



サブマリン型電気泳動槽(上から見たところ)

図1. 電気溶出法。目的のDNAバンドを含むゲルと電気泳動バッファーを透析チューブに入れて電気泳動に供することでゲルから目的DNAを溶出させる。

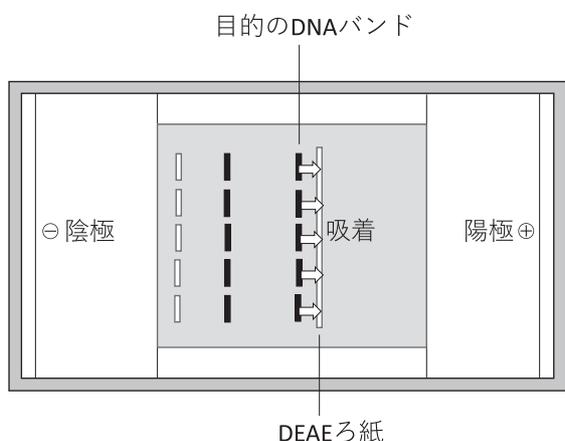


図2. DEAEろ紙法. 目的バンドの下方に切れ込みを入れてDEAEろ紙を差し込む, 再び電気泳動することで目的DNAバンドをDEAEろ紙に吸着させる.

DNA断片は1.5 M NaClにより溶出し, その後エタノール沈殿を行ってDNAを回収する. DEAEろ紙はWhatman社から比較的安価に入手できたこと, また電気溶出よりも簡便かつ迅速にDNA抽出を行えることから, DEAEろ紙法を知った以降はもっぱらこの方法によりDNA抽出を行った.

凍結融解絞り出し法

この手法を知った時, こんな「いい加減な」方法でDNAが抽出できるのかとのけぞったことを覚えている. 特定のDNA断片を含むゲルを -20°C で凍結した後再融解することでゲルマトリックスからDNAをはがして絞り出す抽出法である. 必要なのはパラフィルムだけ(!!). 凍結させたゲル断片をパラフィルムにはさみ込み, 人肌で温め融解しつつ, ゲルマトリックス内の水相を絞り出す. その後エタノール沈殿でDNAを回収してその後の操作に供する. 確実にサブクロニングや標識を行いたい時にはDEAEろ紙法でDNA抽出を行ったが, 急いでいる場合はこの「いいかげんな」方法で急場をしのいだことも少なからずあった.

グラスミルクがない, DEAEろ紙がない, 透析チューブもない, しかしサブクロニングを行わねばならない. こうした状況で威力を発揮する手法として, 過去の手法とせず, 現代でも是非活用されたい.

GENECLEAN Kit法

前述したように, 現在のゲルからのDNA抽出の主流はGENECLEAN Kit法である(同じ原理を利用したDNA抽出キットは他にもあるが「初代」のキットに敬意を表

して, 本稿ではGENECLEAN Kit法と称する). この手法の原理的な胆は高濃度のカオトロピックイオン(このキットではヨウ化物イオン)によるカオトロピック効果にある. カオトロピック効果による水分子間の相互作用の減少によりアガロースゲルの融点は低下する. また, DNAでは水和水がリン酸ジエステル結合からはがされてリン酸基がむき出しになるため, シリカに吸着ようになる. これらの現象を利用したのがGENECLEAN Kit法である. この手法はなんとPNASに掲載されている²⁾. その掲載年は1979年であるが, 1984年発行の文献1には紹介されておらず, 文献1の時点ではまだGENECLEAN Kit法は利用されていなかったようである. これはこのKitの商業化の胆である利用しやすいシリカ粒子(グラスミルク)の開発が十分でなかったためであろう. 確かにGENECLEAN Kitを使いだした当初, グラスミルクの分散性は今一步で, すぐに固まりを生じたという記憶がある. しかし, グラスミルクの改良は継続的に行われたようで, 分散性は格段に向上している. GENECLEAN Kitについて蘊蓄をいくつか述べよう.

1) GENECLEAN Kitを使いだした当初, うまくDNA抽出ができなかった. これは電気溶出法のやり方を踏襲し, あまりにも多量のゲル断片を用いたためである. ゲル量が多すぎると添加できるNaI溶液量が相対的に減り, カオトロピック効果を十分発揮できるだけのNaI濃度を稼げなかったのが原因と思われる. その後, ゲル断片の量を少なくすることにより, きわめて良好にDNAを抽出できるようになった. 定量的に言うと, Mupidの普通サイズのコームを用いた時の1レーンのバンドで十分サブクロニングができる. 多くともひとつのDNA断片に対し2レーン分のゲル断片に抑えた方が良い結果につながる.

2) 洗浄バッファー(NEW Wash)で洗浄後遠心分離してまずNEW Washをデカンテーションで除去する. その後数秒間遠心分離を行い, 残ったNEW Washを遠心チューブの底にくまなく集める. それを, ピペットマンを使って丁寧に残らず除去する. シリカの沈殿は真空乾燥するのではなく, 遠心チューブのふたを開けて5分間ほど風乾させた方がDNAの回収率が良いようである.

3) 目的のDNAバンドを視認するためにはエチジウムブロミド染色とUV照射が必要である. この操作で痛い目があったことがある. 痛い目とは, 回収したDNAを用いたサブクロニングがまったくできなくなってしまったことである. 2~3か月も試行錯誤してやっと分かったことは, UVの波長がこのトラブルの原因であったことである. この時用いていたUVイルミネーターは

280 nmと360 nmの波長切り替えができた。280 nmの方が、DNAバンドがより明るく見えるのもっぱら280 nmのUVを使用していた。なんとこの280 nmのUVでDNAが劣化（おそらくチミジンダイマーの形成もしくはエチジウムプロミドとの共有結合）してしまったのである。まさにUVで突然変異を導入する操作を行ってしまっていたことになる。どうぞくれぐれもDNA抽出するときは360 nm程度の長波長のUVを使用するよう忘れないでほしい。

青色LEDの登場

省エネで長持ちのLED（発光ダイオード）で白色光を作るために必要な光の三原色のうち、青色だけが技術的に困難であった。1990年代初めに赤崎、天野、中村らにより青色LEDが開発され、この技術革新に対して2014年のノーベル物理学賞が授与された。2000年代に入ると青色LEDイルミネーター（波長：500 nm前後）がバイオ用の研究機器としても普及し始め、対応する染色試薬も開発・市販されるようになった。この波長域であればDNAの劣化が少なく、上述のような問題は回避されるほか、日焼けや変異原性といった実験者に対する危険性も回避できる。若い研究者諸君には青色LEDしか使ったことがない方もおられるかもしれない。これも先人が積み重ねた痛い失敗のうえに提案された解決策であることを知っておいてほしい。

おわりに

トラブルシューティングができて初めて一人前の研究者だ、とよく学生に言う。確かにどの先生もいくつかのトラブルシューティングストーリーを持っている。トラブルシューティングを振り返ってみると、結局、当該操作の原理や学問の基礎に立ち戻ることによってトラブルシューティングできることが多いようである。何らかのトラブルが生じた時は、即座にトラブルシューティングをあきらめるのではなく（たとえば、別のキットを使ってしまふなど）、どうぞ原理原則に立ち戻って対処していただけたらと思う。

今回の記事は、実は前記の3)を紹介したくてお引き受けした。3)の内容を吟味している中で、「そういえばDNA抽出法っていろいろな手法があったな」と気づき、いにしへのDNA抽出法も交え記事化してみた。自慢話をするようで恐縮だし、また、大したトラブルシューティングではない。しかし、本記事を読むことで数か月にわたるかもしれないトラブルを回避できるとするならば、その自慢話もご容赦いただけるのではないかと思う。

文 献

- 1) Gastra, W. and Jørgensen, P. L.: *Methods in Molecular Biology* (Walker, J. M. ed.), p. 67, Humana Press, Clifton, New Jersey (1984).
- 2) Vogelstein, B. and Gillespie, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 615 (1979).