

Pippin PrepでDNA移動度の再現性を得るためのコツ！

1. DNA量 ($\mu\text{g}/\text{lane}$)

⇒泳動DNA量が多くなるとレーンの渋滞が起こり、移動度が遅くなる。
(設定サイズよりも小さいフラグメントが回収される)

2. DNAのサイズ分布

⇒スメアなバンドかシャープなバンドかで、同じDNA量でも移動度が異なるため、断片化条件で移動度が変わる。

3. DNA溶解バッファーの組成

⇒バッファー中のイオン濃度で移動度が変わる。

4. DNA溶液中の不純物(精製純度)

⇒タンパクや糖などの不純物が電荷を持つため、移動度が変わる。
泳動色素の有無でも、移動度に影響がある。

5. DNAのGC含有量

⇒GC/AT比の違いは、同じ塩基数でも電荷が異なるため、移動度に影響する。

6. 泳動バッファー量

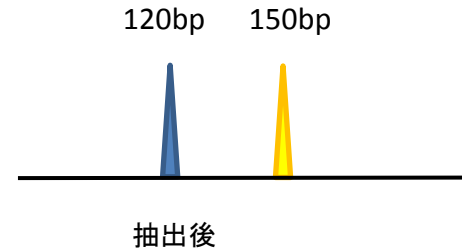
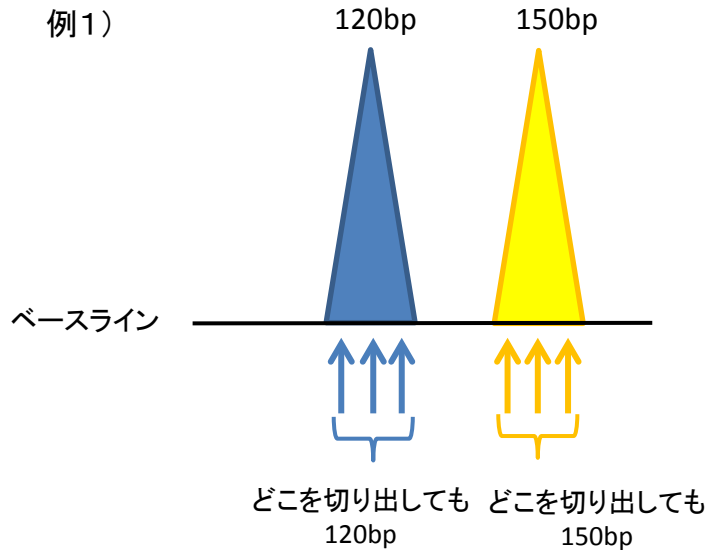
⇒リザーバの液量が著しく異なると、通電量を変えてしまうため、均等の液量であることが望ましい。

* 上記の1～4の**インプットサンプル要因を一定にする**ことが、泳動の再現性を得るための最重要ポイント。

電気泳動とDNA抽出基礎情報 (エレクトログラムの読み取り方)

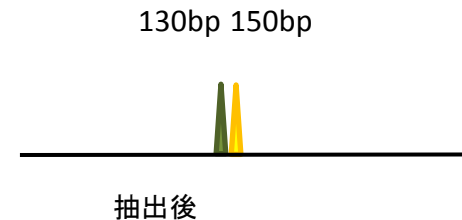
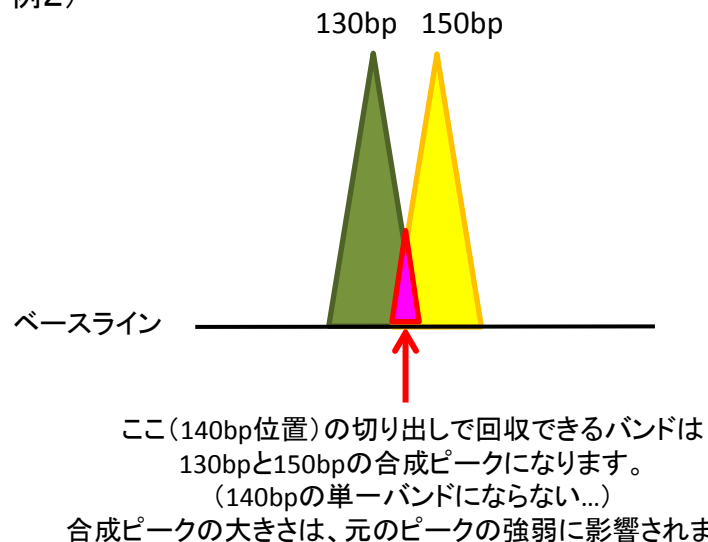
電気泳動では、泳動量によってはサイズが広がって移動する場合があります。

例1) 1つの大きなピークならばピークのどこを切り出しても、同じサイズになります。



例2)

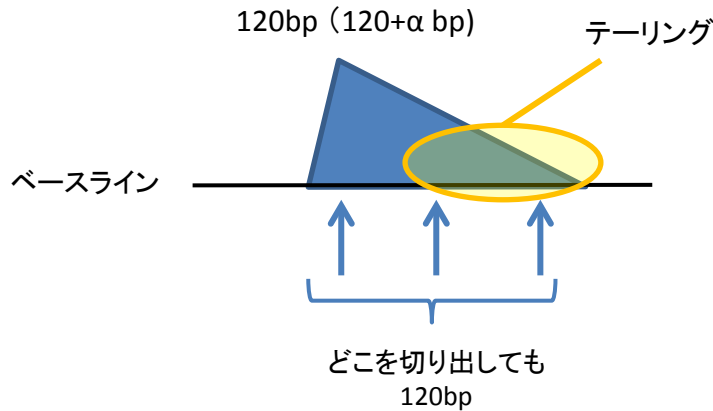
例2) 2つのピークが交わった部分を切り出した場合は、2つのピークが回収されます。
(注: 中間サイズの単一バンドにはなりません。)



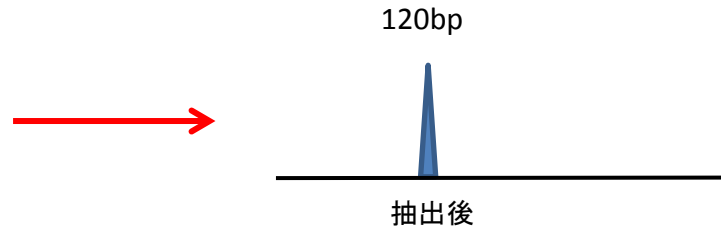
電気泳動とDNA抽出基礎情報

(エレクトログラムの読み取り方)

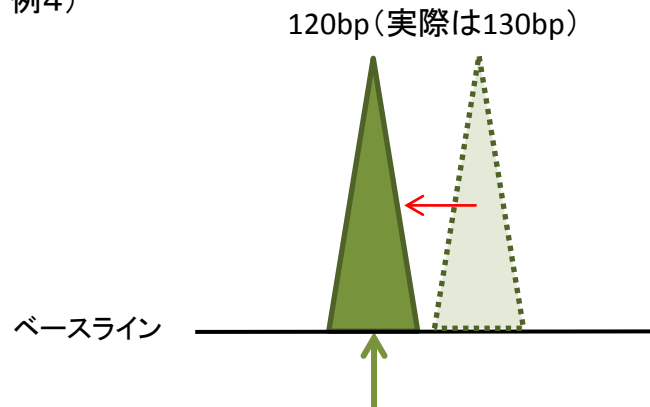
例3)



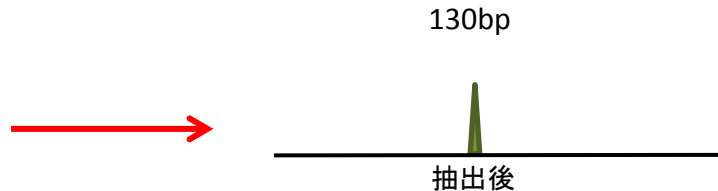
例3) 単一ピークで泳動量が多い場合は、高分子側にテーリングします。(最適量は泳動装置毎に異なります。)
* ピークトップも大きくなる場合があります。
(DNAがゲルマトリックスを渋滞しながら、遅く進むようなイメージです。)



例4)



例4) 抽出前サンプルの塩濃度が高い場合は、泳動での通電量が増えて移動度が速くなります。
(夾雑物によっては逆の場合もあります。)



塩濃度や夾雑物の影響で実際のサイズよりも速く移動して見かけのサイズが小さくなり、間違ったサイズを抽出してしまいます。

* 例3と4の現象は掛け合わせが発生するため、より複雑な移動度変化が発生する場合があります。