



エチジウムブロマイドの簡単明瞭な処理方法

藤原 信明*・増井 昭彦

先に、食品副産物である“オカラ”が電気泳動で用いられる染料coomassie brilliant blue (CBB) を非常によく吸着し、この特性を活かせば染色廃液が脱色液として再利用できることを紹介した¹⁾。その後、この材料が遺伝子工学実験で多用されるエチジウムブロマイド (EtBr, 図1) や、変異処理で使われるアクリジンオレンジ (AO, 図2) を迅速に吸着することがわかった²⁾。EtBrは強い変異原性を示すことからCBBよりも処理の必要性が高いので、今回はその事例を紹介する。

EtBr 処理の現状

遺伝子工学実験マニュアルには、EtBrの取扱注意とともに使用後の処理も併せて記載されている。その処理の基本原則は、EtBrが変異原性を示すことから、環境への影響に配慮して河川などに排出しないことである。EtBrの諸性質については、製品安全データシートを参照されたい³⁾。EtBrの処理は、Molecular Cloning⁴⁾に種々の方法が詳しく紹介されている。処理キットもいくつか商品化されており、主に活性炭や樹脂を用いての吸着で、形態はカラムやバッグなどである⁵⁾。なお、EtBrの処理として、古くは次亜塩素酸(bleach)で処理する方法が記載されていたが、より危険な化合物に変わるとの報告もあり^{6,7)}、今では推奨されていない^{4,8,9)}。

オカラによる EtBr の吸着処理

オカラによるEtBr吸着の経時変化を図3に示す。活性炭や樹脂よりもはるかに早く吸着でき、その挙動はCBB吸着の場合よりさらに顕著であった¹⁰⁾。また、AOも同

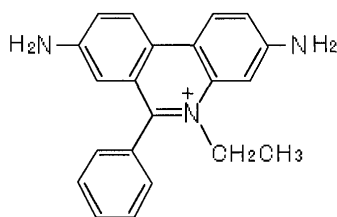


図1. エチジウムブロマイド (EtBr) の構造

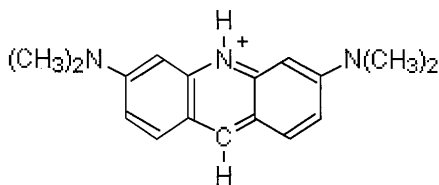


図2. アクリジンオレンジ (AO) の構造

様に迅速に吸着された。

オカラを用いたEtBr処理でさらに長所と考えられるのは、吸着限界の見極めの容易さである。EtBr溶液は薄い赤色であるので、黒色の活性炭や褐色の樹脂では吸着状況を把握することは難しい。また、処理液の色からも、吸光度が0.05以下になると着色の有無を目視で判断するのは困難である。そこで市販品では吸着の終点を確認できるように工夫されている。たとえば、システムの最終ラインに白色の吸着材(樹脂)が別途組み込まれていて、過負荷でカラムを通過したEtBrが確認できる。一方、オカラの場合はそれ自身が白色なのでEtBrの吸着は明確であり、特に確認のための指標樹脂は必要とはしない。

EtBr 吸着処理の実際

実際のEtBr吸着処理であるが、CBBの場合と同様に適当なカラムに吸着材を詰めてEtBrを含む廃液を流せばEtBrはオカラに吸着される。ただし、EtBrは変異原性があるので、処理中はもちろん吸着後もその取り扱いには十分な注意が必要である。処理後の扱いが安全で容易な方法として、ここではディスポーザルのプラスチック製注射器を利用したEtBr処理を紹介する。用いるのは市販のディスポシリンジの筒(内径28 mm, 容量50 ml, @約150円)である。シリンジには容量の目盛りがついているので流速を測るのに便利である。EtBr染色バット

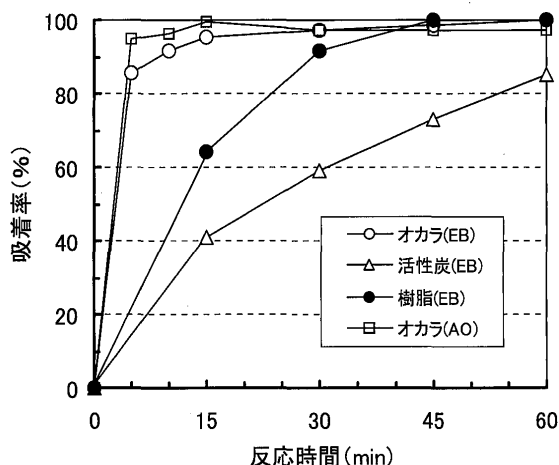


図3. EtBr吸着の経時変化。100 ml容の三角フラスコにEtBr水溶液(濃度8.8 mg/l) 30 mlを入れ、これに吸着材としてオカラ(市販品を凍結乾燥)、活性炭(和光純薬工業製、顆粒状)、樹脂(Destaining bags, Continental Laboratory Products社製、@720円)をそれぞれ0.3 g投入して、25°Cで1時間振とう(100往復/分)した。ろ過後、275 nmにおける吸光度を測定し、初期濃度との比較から吸着率を求めた。対照として、EtBr溶液を入れずに同様の実験を行い、吸光度を補正した。

* 連絡先 大阪府立産業技術総合研究所 E-mail: fujiwara@tri.pref.osaka.jp

の容量は100～200 mlであるので、処理時間節約のためにはもう少し大きな容量が欲しいが、市販されているのは今のところこれが最大のようなのである。以下に手順を示すが、要はカラムクロマトの準備と同じである。

- 1) 先端部にシリコンチューブを接続し、ピンチコック（ホフマン型）をつける。
- 2) 筒の底部にフィルターとして厚手のフェルトや不織布（直径28 mm）を敷く。目が粗い場合、No.2, No.5A, No.526などろ過速度の大きいろ紙を上重ねて敷くとよい。
- 3) 乾燥オカラ2 gを詰める。
- 4) 上層に観賞魚水槽用ポリエステル（PE）ろ過綿を詰める。
- 5) 蒸留水を徐々に加えてオカラを水和させる。（コックは閉めておく）
- 6) 蒸留水を約20 ml流して洗浄する。
- 7) ピンチコックを調節して流速15 ml/minでEtBr廃液を流す。（液は事前にビーカーなどに移しておく）

（補足説明）

- 乾燥オカラ2 gが吸水すると10～15 mlとなる。オカラの粗さにより容積は変わるので、この容量を目処に詰める。
- 2g程度であれば、カラムの中で吸水・膨潤させてもよい。その方がきれいに詰まり、吸着は確実となる。
- 水を一度に加えると気泡が入るので、徐々に加える。
- 詰まり具合が一樣でないで廃液が短絡して通過する可能性がある。その場合は中止する。詰まり具合はEtBrの染着状況からわかる。

オカラにEtBrが吸着した状態を図4に示す。吸着実験は、染色に通常用いるEtBr濃度0.5 $\mu\text{g/ml}$ で200 mlを1回の処理量として行った。EtBrはカラム最上部のオカラに結合して緊密な赤色のバンドとして観察される。このことはオカラの吸着力が非常に強いことを示している。今回の系では、10回処理（合計2 l）後も吸着能力に余力がある（図4右）。なお、塩濃度が高くなると若干吸着能力は低下するので、塩濃度が高い使い古したEtBr廃液を処理する場合は、吸着バンドの状況を確認しながら処理を行った方がよい。なお、吸着処理全般に言えることであるが、吸着の進行は染着バンドで確認できるが、最終的な判断は流下液の蛍光を確認する必要がある。今回の系では、処理ごとの流下液について枯草菌DNAを等量混合して蛍光の有無を確認したが、10回処理後も蛍光は認められず（図5）、吸着は完全に行われていた。

活性炭処理でも指摘されているが、長期間の使用は吸着材の表面に微生物が生育する可能性もあるので、処理液はペットボトルに1 l程度貯めて一度に処理するか、あるいは処理ごとに交換するなど、一度限りの使用を薦める。

吸着後、オカラはEtBrが高濃度に集積された状態にあ

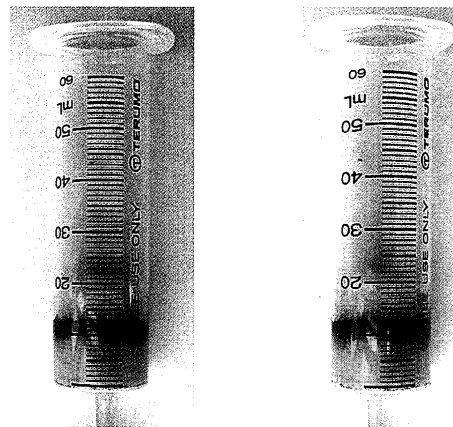


図4. オカラへのEtBr吸着（左、1 l処理後；右、2 l処理後）。内径2.8 cmのディスポーシングに乾燥オカラ2 gを詰めて水和の後、EtBr液（0.5 $\mu\text{g/ml}$ ）を流した。1回の処理量は200 mlで、流速は15 ml/minである。

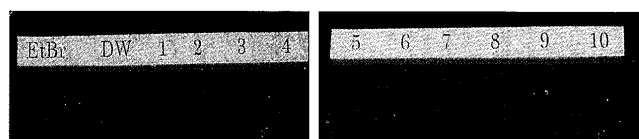


図5. 処理液の蛍光の観察。EtBr, EtBr液（0.5 $\mu\text{g/ml}$ ）；DW, 蒸留水；数字は処理回数を表す。蛍光は10 μl の流下液と等量の枯草菌DNAを混合、312 nmの紫外光を照射して観察した。

るので、その取り扱いには注意が必要である。カラムの注射筒にプランジャーを挿し押し込めば、これらを完全に閉じ込めることができる。EtBrは262°Cで分解されるが、EtBrが吸着したオカラは医療廃棄物の取り扱い業者に処分を依頼するなど、確実に焼却あるいは高温によって処理されるルートで廃棄する。

文 献

- 1) 藤原信明：生物工学，**81**, 539 (2003)。
- 2) 特開2007-29815号「変異原物質吸着材」
- 3) [http://dominoweb.dojindo.co.jp/MSDS-Pab.nsf/view_display/C86976FE1A4F128F49256CC3001ECD2A/\\$File/E272.pdf](http://dominoweb.dojindo.co.jp/MSDS-Pab.nsf/view_display/C86976FE1A4F128F49256CC3001ECD2A/$File/E272.pdf)
- 4) Sambrook, J. and Russel, D. W.: *Molecular cloning, A Laboratory manual*, 3rd ed., p. A8.27, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)。
- 5) たとえば、日本ジェネティックス、バイオ研究用カタログ，p.130 (2005)，コスモバイオ、バイオ機器カタログp.207 (2003-2005)，あるいは <https://www.mn-net.com/web/5CMN-WEtBr-Biokatalog.nsf/Web/FramesE?Open&showpage=BIOBONDEX>
- 6) Lunn, G., and Sansone, E. B.: *Analytical Biochemistry*, **162**, 453 (1987)。
- 7) Cohen, B. L.: *Trends in Genetics*, **3**, 308 (1987)。
- 8) <http://ehs.ucdavis.edu/sftynet/sn-53.cfm>
- 9) http://info.anu.edu.au/hr/OHS/Hazard_Alerts/_Ethidium_Bromide.asp
- 10) 西川章江ら：大豆たん白研究，**7**, 64 (2004)。

（2007年6月29日受付 2007年10月9日受理）