

MagneSil™ Paramagnetic Particlesを使ったDNA精製のための多検体処理法



By Walter Brandes
Promega Corporation

MagneSil™ Paramagnetic Particles (PMPs)[®]により、核酸精製を迅速かつ効率的に行なうことができます。この粒子は、自動化された機器(ロボット)での使用に適した多くの特長を持ち、精製過程の完全な自動化を可能にします。そのため、MagneSil™は多検体処理のアプリケーションに理想的な汎用性の高いテクノロジーといえます。本稿ではDNAフラグメントやプラスミドDNAの精製におけるMagneSil™ PMPsの有用性を、特にシークエンシング前後のクリーンアップに関連して、紹介します。

はじめに

プロメガではMagneSil™ テクノロジーを、世界中の研究者の変化する核酸精製のニーズに合わせて特に開発しました。この手法はバキューム法や遠心法を基にしたフォーマットの核酸精製に代わるプロメガ独自の精製基盤を採用しています。MagneSil™ PMPsは、他社から市販されている磁性粒子と比べ、結合速度論および結合効率の面で多くのユニークな特性を持ちます。例えば、この粒子は撈拌が容易であるため、洗浄時の混入物の除去効率が上がります。さらに、粒子が小さいため磁界における高速な運動が可能となり、高純度の核酸を素早く効率的に単離できます。核酸の結合に影響する化学的性質やこれらの粒子の物理的特徴を深く理解することで、核酸のタイプや大きさに基づく選択的な結合条件の最適化を行いました。このようなMagneSil™ PMPsの物理的特徴は、核酸精製過程の完全な自動化に理想的です。MagneSil™ PMPsはその汎用性により広い用途を持ちます。この製品は、プラスミドDNAを溶液中に保ったままバクテリアの溶解液を物理的に除去したり、溶解液からエンドトキシンを選択的に除去するために使うことができます。プロメガではBiomek® 2000 (Beckman Instruments, Inc.)やGenesis (Tecan)システムを含む自動化機器での使用のために複数のアプリケーションを開発中です。これらのアプリケーションには、プラスミドDNAやPCR[®]フラグメントの単離、シークエンシング反応からゲル解析前に余剰なダイを除去するためのクリーンアップが含まれます。

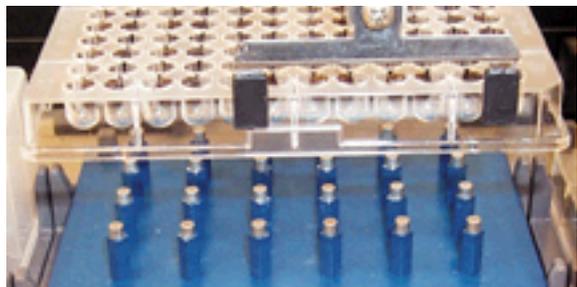


図1. MagnaBot™ Magnetic Separation Deviceとプレートの組み立て
Biomek® 2000ワークステーションの自動グリッパーが部分的に見えています。

DNA精製法

プラスミド精製

プロメガでは、MagneSil™ PMPsとMagnaBot™ Magnetic Separation Device (図1)を使い、Biomek® 2000用に完全自動化したプロトコルを開発しました。この手法を用いれば、96サンプルフォーマットのそのままシークエンシングに使える「プラスミドDNA精製をマニュアル操作なしで、2時間未満で行えます。最初はバクテリアの溶解液の除去、続いてプラスミドDNAの結合のためにそれぞれの分離ステップで固有の磁性粒子が使われ、遠心やフィルター過の必要がありません。O.D.₆₀₀で2~10まで培養した大腸菌を96ウェルプレートで処理できます。O.D.₆₀₀で3~4のpGEM®-3Zf(+) Vector DNA[®]などのハイコピー数のプラスミドを持つ大腸菌では、プラスミドDNAの収量は3~5µg程度です。図2に示されるように、この手法を用いて精製したDNAテンプレートは自動化蛍光シークエンサーでお使いいただけます。

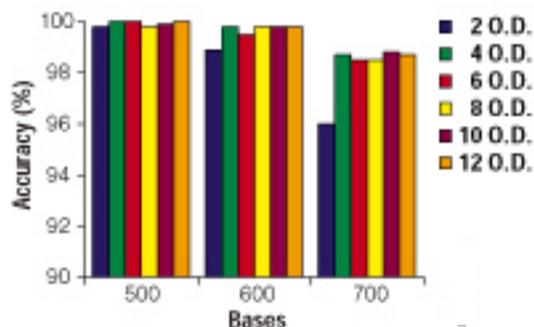


図2. MagneSil™ Paramagnetic Particlesにより精製したプラスミドDNAをシークエンシングした時の解析鎖長に示される正確さ
プラスミドDNAは、BigDye™ターミネーターを使って製造元のマニュアルにしたがいシークエンシング反応が行なわれた。結果はBI PRISM® 377を使って解析した。

蛍光ダイターミネーターの除去

BigDye™ターミネーターを用いた自動蛍光シークエンシングは、多検体シークエンシングにぴったりの手法です。ダイ標識されたターミネーターを解析の前に取り除かなければ、0~150ベースの範囲のシークエンシング過程で伸長したDNAによるシグナルに干渉し、塩基決定のアルゴリズムで問題となります。ゲルろ過やエタノール沈殿によるクリーンアップ法は、精製過程の自動化を試みる多検体ユーザーにとって問題となります。MagneSil™ PMPsはこのようなアプリケーションのために開発されているので、標準の96ウェル増幅プレートを用いるBiomek® 2000やGenesisロボットワークステーションでの使用に適します。予備実験の結果は、このテクノロジーが他の精製方法と比べて優れていることを示しており(図3)、本当の意味で手動操作を必要としない優れたプロトコルであることを証明しています。ロボットのデッキにプレ

ートを載せてからサンプルをシーケンサーに装填するまで、実際に手を使う作業は全く不要です。

PCR産物精製

MagneSil™ PMPsを使った開発中のアプリケーションは、増幅後のPCR産物のクリーニングを目的としています。PCR後のほとんどのアプリケーションで、増幅反応液に一般に存在する余剰なプライマーやプライマーダイマー、取りこまれていないヌクレオチド、バッファー成分、酵素、その他の非特異的な増幅産物を、PCR産物から除去する必要があります。従来の精製法にはゲル電気泳動法、沈殿法、酵素による消化、シリカメンブレン、イオン交換クロマトグラフィーなどがあります。これらの手法では、目的とするPCR産物の精製はできるのですが、時間がかかり複数のサンプルで実施するのが難しく自動化には向きませんでした。適切なカオトロピック塩と酢酸の存在下では、MagneSil™ PMPsは2本鎖DNAに選択的に結合し、不要な反応成分は溶液中に残ったままです(図4)。MagneSil™ PMPsに結合した非特異的なコンタミ成分を除去するために一連の洗浄操作を行った後、水を加えるだけで目的のNAが溶出されます。反応条件は次のように最適化されています。i) 100-150bpより大きいPCR産物の精製に適応させる、ii) 100µlの増幅反応から80%、10µgの収量を得る、iii) 取り込まれなかったプライマーやヌクレオチドの99.5%以上を除去する。この手法により96サンプルのPCR増幅産物を手動操作なしに1時間で精製できることが示されました。

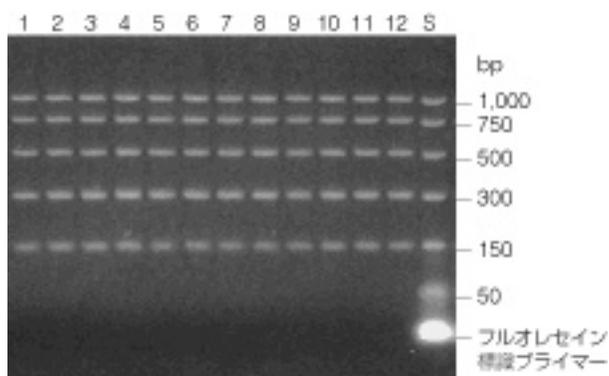


図4. 低分子量DNAフラグメントの選択的除去
DNAフラグメントはMagneSil™ PMPsを使って精製された。精製産物は2%アガロースゲル電気泳動で分析した。レーンSは精製前のサンプル。

まとめ

MagneSil™ Particlesは精製技術の飛躍的な進歩を象徴しています。この粒子は自動化機器へ適用することにより、理想的な多検体の精製ツールとなります。プロメガでは、MagneSil™テクノロジーを用いて様々な核酸精製の迅速かつ効率的な手法を開発しています。プロメガは、創造的なソリューションを今日の研究課題にもたらし、さらに多くのライフサイエンスの研究活動へのソリューションを紹介するためにこれからもユーザーの方々とともに歩みつつけます。現在、プロメガではHTS研究チームに対して次のようなサービスを行なっています。カスタム・パッケージング、コンポーネントのバルク生産、製品のカスタマイズ、お客様のニーズに合わせたアプリケーション。お客様のチームにもHTSのためのアプリケーションをサポートしたプロメガのソリューションの導入をご検討くださいますようお願いいたします。

^①Patent Pending.

^②The PCR process is covered by patents issued and applicable in certain countries. Promega does not encourage or support the unauthorized use of the PCR process.

^③U.S. Pat. No. 4,766,072.

プロメガのHTSチームから 顧客サービスのカスタム化

創薬は複雑で多くの資源を必要とする学問分野です。『現在商品化されている製品のほとんどが、たいていの創薬プログラム特有の試験のニーズを満たさない』と、この分野では一般的に考えられています。我々はこの重要な研究分野において特殊なニーズに合う選り抜きのカスタムアプリケーションを開発するためにテクニカルサポートを強化しています。MagneSil™ PMPsでの実績は、プロメガのお客様のニーズへの柔軟で意欲的なサービスがいかに広範なアプリケーションの開発へとつながっているかを示す良い例です。HTSユーザー様や機械メーカー様(例えばBeckman-Coulter社やTecan社)とともに研究し、プロメガの研究グループは、プラスミド精製に使われるMagneSil™ PMPsとバッファーを複数の自動化プラットフォームに適用しました。このような研究のいくつかを、付随する記事で説明しています。これらの記事は、プロメガが上記のようなカスタムアプリケーションを開発するためにいかに活動しているかを表すものとなっています。MagneSil™ PMPsカスタム製品や創薬アプリケーションについて詳しい情報を知りたい方はプロメガのHTSチームまでご連絡ください(eメール: hts@jp.promega.com、電話: 03-3669-7980、ファックス: 03-3669-7982)。

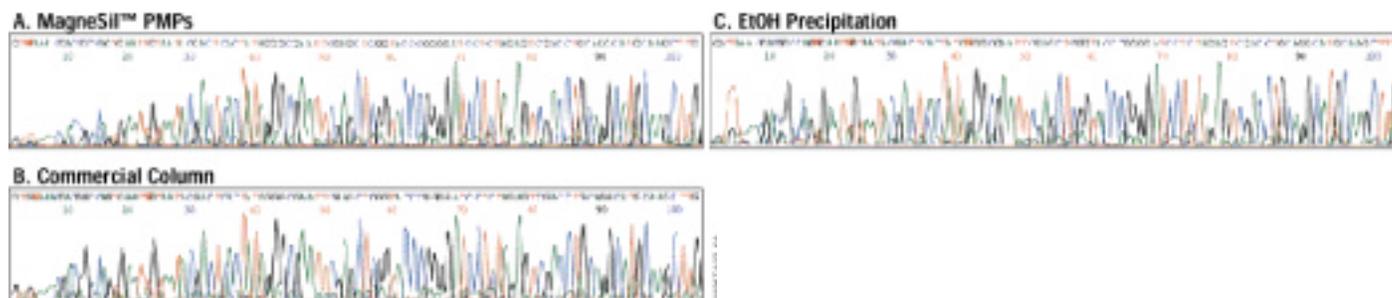


図3. MagneSil™ PMPs による精製法で調製されたDNAをBigDye™シーケンシングキットとABI PRISM® 377自動シーケンサー(The Perkin-Elmer Corporation)を用いてシーケンスしたサンプルの電気泳動図