

プロメガ DNA Binding Plate を Beckman Biomek® 2000 に使用したゲノム DNA の自動単離



By terri Grunst, B.S.
Promega Corporation

要約

ゲノミクスアプリケーションでは、膨大な数のサンプルからゲノム DNA の単離を行なう必要性がたびたび生じます。そのため、このようなサンプルに対する多検体処理が必要とされています。本稿では、様々なサンプルからプロメガの Binding Plate を Beckman Biomek® 2000 で用いてハイスループットのゲノム DNA 単離を行なう方法を紹介いたします。

はじめに

ハイスループットのゲノム DNA 単離に用いる手順は、良質の DNA が迅速に単離できるようなものでなければなりません。プロメガでは、Beckman Biomek® 2000 を使用して様々なサンプルから 96 ウェル形式でゲノム DNA を単離する強力な手順を開発しました。この手順を用いれば、Wizard® SV 96 DNA Binding Plate (カタログ番号 A2271) を使用して、マウス尻尾片、植物組織、組織培養細胞、全血、または口腔粘膜の溶解液から、たった 1 時間でゲノム DNA を精製することができます。精製は、サンプルの種類にかかわらずひとつの自動化手順で行なうことができます。単離されたゲノム DNA は高品質で、PCR 解析の優れたテンプレートとなります。また、これらの試験で、DNA の精製手順に起因するサンプル間のコンタミは認められていません。

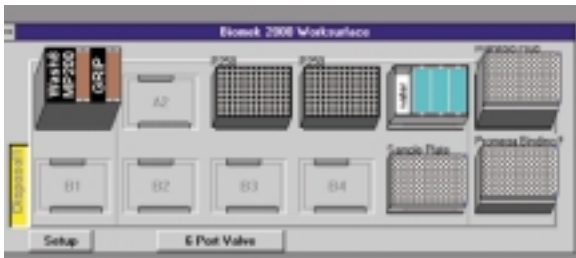


図 1. Biomek® 2000 のデッキの初期設定

Wash 8, MP200, Gripper が必要で、すべてポジション A1 に設置する。ポジション A2 および B1 ~ B4 には何も設置しない。P250 チップの箱は、ポジション A3 および A4 に設置する。ポジション A5 には、10ml の Nuclease-Free Water (カタログ番号 P1193) を充填したリザーバーを設置する。ライセートの入った 96 ウェルプレートはポジション B5 に設置する。Binding Plate はポジション B6 に設置する。2つの吸引装置はポジション A6 および B6 に設置する。DNA の溶出はポジション A6 で行ない、DNA の結合および洗浄はポジション B6 で行なう。

表 1. 本文中に記載されたサンプル種からの溶解液調製プロトコール

手順	
マウス尻尾	<ol style="list-style-type: none"> 1. マウス尻尾片を、0.5cm 当たり 200µl の Nuclei Lysis Solution、48µl の EDTA (0.5M)、および 17.5µl の Proteinase K (20mg/ml) 溶液で消化する。ボルテックスして混和する。 2. 55 °C でときどき攪拌しながら 3 時間から 1 晩インキュベートする。 3. 消化後、SV RNA Lysis Buffer を 250µl 添加し、ボルテックスして混和する。 <p>注: 溶解液は -70 °C で保存できます。</p>
植物組織 (トマト葉)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 100mg の植物組織を、乳鉢を使用して液体窒素中で微粒子状になるまで破碎する。 2. 液体窒素が蒸発した後、乳鉢内の粉末化組織に 1.5ml の SV RNA Lysis Buffer を添加する。 3. 組織の塊や繊維が見えなくなるまで SV RNA Lysis Buffer 中でさらに破碎する。 4. 溶解液を新しい 1.5ml 微量遠心チューブに移す。 <p>注: 溶解液は -70 °C で保存可能。</p>
CHO 細胞	<ol style="list-style-type: none"> 1. 細胞を 96 ウェルの組織培養プレートで 1 ウェルあたりの細胞数が 1×10^6 個となるように培養する。 2. 細胞を $1 \times$ PBS で 1 回洗浄する。 3. SV RNA Lysis Buffer を 1 ウェル当たり 150µl 添加する。ピペッティングにより混和する。 <p>注: 細胞溶解液は -70 °C で保存できます。</p>
全血	<ol style="list-style-type: none"> 1. 全血 200µl に Lysis Buffer (SV RNA Lysis Buffer + 1% Triton® X-100) 400µl を添加する。ボルテックスして混和する。 <p>注: 溶解液は保存できません。用時調製してください。</p>
口腔粘膜	<ol style="list-style-type: none"> 1. 口腔内を清浄なピペットチップで掻き取る。 2. このピペットチップを、150µl の 0.97% β-メルカプトエタノール含有 SV RNA Lysis Buffer 中で振る。ボルテックスして混和する。 <p>注: 口腔サンプル採取には綿棒を使用しないでください。綿棒の繊維によって、Wizard® SV 96 DNA Binding Plate が目詰まりする可能性があります。</p>

Automated Genomic DNA Isolation...continued

表 2. ゲノム DNA 単離用の Biomek® 2000 プログラム

手順	作業内容
1	Biomek® 2000 によって、96 ウェルサンプルプレートから Binding Plate に 150µl のサンプル溶解液が移される。サンプル溶解液は吸引によってプレートを通過し、DNA が結合する。
2	Wash 8 ツールを使用して、500µl の 60%エタノール含有 Wizard® SV 96 Wash Solution でサンプルを 2 回洗浄する。
3	Binding Plate を軽く吸引乾燥する。
4	Binding Plate を、B6 の吸引装置ポジションから、A6 の吸引装置ポジションに移動し、吸引装置のカラーを取り付けた溶出プレート上面に設置する。
5	Binding Plate に Nuclease-Free Water (75µl) を添加することにより、DNA を溶出プレートに回収する。

ゲノム DNA の自動単離

サンプル溶解液の調製方法は、ゲノム DNA 単離に用いるサンプルの種類によって異なります。表 1 に、本稿のため検討したサンプル種類の溶解液調製法を簡単に記載しました。溶解液を一旦調製してしまえば、その後は Beckman Biomek® 2000 を使用してどのような種類のサンプルからも同一のプロトコールでゲノム DNA を単離することができます。

ゲノム DNA の場合、調製した溶解液を 96 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 150µl 添加し、このプレートを Beckman Biomek® 2000 のデッキに設置します。図 1 に示したように、Biomek® 2000 デッキの残り部分は、プログラムのデッキ初期設定にしたがって組み立てます。設置後、Biomek® のプログラムを開始します。処理には 96 ウェルプレート 1 枚(最大 96 サンプル)当たり約 1 時間を要します(表 2 をご参照ください)。

解析

精製したゲノム DNA を、75µl の Nuclease-Free Water (カタログ番号 P1193) で溶出します。マウス尻尾、植物組織、および組織培養細胞サンプルの場合は、20µl の分画をアガロースゲル電気泳動により解析しました(図 2)。

ゲノム DNA の優良品は、PCR で評価しました。1µl のゲノム DNA を使用して、50µl の反応液中で PCR 増幅を行ないました。プライマーには、目的のゲノム DNA シークエンスに特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを使用しました。具体的には、マウス尻尾サンプルには IL-1 遺伝子を、CHO 細胞サンプルには β -アクチンを、トマト葉サンプルには葉緑体 DNA の非翻訳領域(1)を使用しました(図 3)。

サンプルの交差汚染は、96 ウェルプレート内の一連の血液サンプルおよび口腔粘膜サンプルを、水を入れたコントロールと交互にアッセイすることによって調べました。すべてのウェルにおいて、プロトロンピン転写物を PCR のターゲットとしました。図 4 から明らかなように、この実験ではサンプル間のコンタミは認められませんでした。

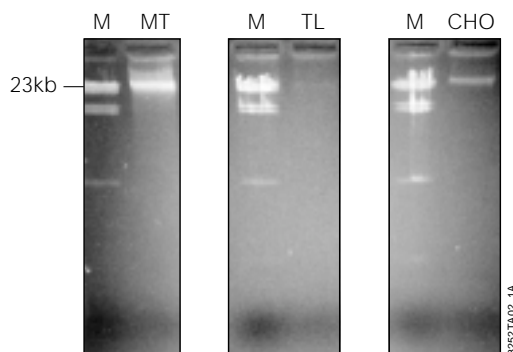
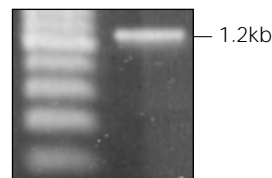


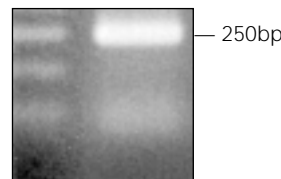
図 2. マウス尻尾(MT)、トマト葉(TL)、および CHO 細胞から精製したゲノム DNA のアガロースゲル電気泳動

75µl の調製液から 20µl の分画を取って 1%アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイド染色で視覚化した。レーン M、Lambda DNA/*Hind* III Markers (カタログ番号 G1711)。

A. Mouse Tail



B. CHO Cells



C. Tomato Leaf

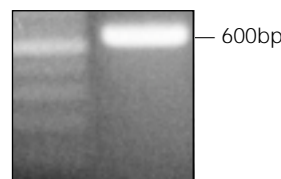


図3. マウス尻尾、CHO 細胞、およびトマト葉サンプルの各 1µl から増幅した PCR 産物のアガロースゲル電気泳動

10µl の PCR 産物を 1.5%アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイド染色により視覚化した。パネル A : マウス尻尾から増幅した IL-1 (1.2kb)。パネル B : CHO 細胞から増幅した β -アクチン(250bp)。パネル C : トマト葉から増幅した葉緑体 DNA (600bp)。レーン M、1kb DNA Ladder。

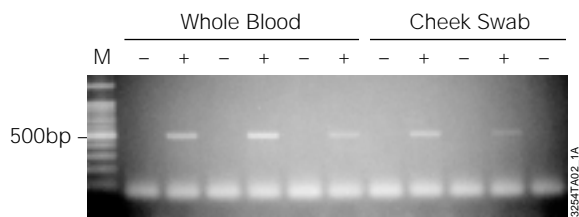


図 4. 交差汚染の解析

全血および口腔粘膜サンプルから増幅した PCR 産物のアガロースゲル電気泳動。プロトンピン遺伝子の 600bp のフラグメントを含む PCR 産物 10 μ l を、1.5% アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイド染色により視覚化した。PCR には水のみを添加したウェルも用い、得られたサンプルを同一のゲルで視覚化した。(+) 組織溶解液。(−) 水のみを添加したウェル。レーン M、1kb DNA Ladder。

考察

この自動化ゲノム DNA 単離システムの長所は、使用手順の柔軟さにあります。本研究では、一般的なサンプル数種を選びゲノム DNA を単離しました。使用したサンプルの種類は、処理が簡単なもの(例えば、組織培養細胞など)から、難しいもの(例えば、全血および植物組織など)まで、多岐にわたっています。

この自動化手順を使用して精製したゲノム DNA は、ほとんどが 23kb 以上のインタクトなゲノム DNA で構成されています。精製後の DNA にはごくわずかな RNA も含まれていますが、溶出した DNA に RNase ONE™ Ribonuclease (カタログ番号 M4261)を 1 μ l 直接添加するか、DNA 溶出に用いる Nuclease-Free Water に 10ml 当たり 100 μ l 添加することによって、容易に除去することができます。精製したゲノム DNA は、PCR で増幅でき、多くの下流のアプリケーションでの使用に適します。ゲノム DNA 単離の所要時間は、マニュアル操作なしで 96 ウェルプレート当たり約 1 時間です。1 回の実験操作で多数のサンプルを交差汚染させることなく処理できます。

この自動化ゲノム DNA 単離システムが不得意とするのは、粘性の高いサンプル溶解液の処理です。過剰な細胞残さが含まれるサンプル溶解液は粘性が高く、Binding Plate をうまく通過しません。このようなサンプルの場合、プレートのウェルが詰まることもあります。本研究で処理したサンプルに関しては、サンプル溶解液の調製方法および溶液量を最適化してあります。良好なゲノム DNA 単離結果を得るには、その他のサンプルについても手順の最適化が必要です。

結論

プロメガの Wizard® SV 96 DNA Binding Plate を Beckman Biomek® 2000 に用いることによりハイスループットフォーマットでゲノム DNA の単離ができます。本稿に記載した自動化手順を用いれば、精製後の各種アプリケーションに適した 23kb を上回る良質なゲノム DNA を単離することができます。ここでは、さまざまな種類のサンプルからゲノム DNA を単離することにより、本手順の順応性を示しました。この自動化手順では交差汚染が検出されなかったことも特記すべき点と言えます。

参考文献

1. Taberlet, P. *et al.* (1991) *Plant Mol. Biol.* **17**, 1105-1109.

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格 (¥)
Wizard® SV 96 DNA Binding Plates	10パック	A2271	110,000
Wizard® SV 96 Wash Solution	185ml	A1311	10,000
SV RNA Lysis Buffer	50ml	Z3051	6,000
RNase ONE™ Ribonuclease	5,000U	M4265	46,000
	1,000U	M4261	12,000
Proteinase K	100mg	V3021	15,000
Nuclei Lysis Solution	100ml	A7941	4,000
	1 liter	A7943	55,000
Nuclease-Free Water	50ml	P1193	6,000
0.5M EDTA	100ml	V4231	16,000
Triton® X-100	100ml	H5142	4,000