



Wizard® MagneSil™ PCR Clean-Up System

By Sandra Splinter BonDurant, M.S.¹, David Frisch, Ph.D.¹, Matt Lawler, B.S.¹, Fredrick R. Blattner, Ph.D.¹, and Randall L. Hoffman, B.S.²,
¹University of Wisconsin Biotechnology Center, Gene Expression Center, Madison, WI, ²Promega Corporation

要約

発現差異解析は、様々な微生物の病原性を遺伝子レベルで理解する上でも非常に有用なツールになりました。高密度のマイクロアレイは、多検体の分析を可能にしますが、自動化に困難な部分が存在します。本稿では、Wizard® MagneSil™ PCR Clean-Up SystemとBeckman Biomek® FXを組合わせた、大腸菌遺伝子のPCR増幅産物を自動的に精製する方法をご紹介します。

はじめに

cDNAマイクロアレイ分析を成功させるための重要なポイントの1つは、PCR産物の精製です。取り込まれなかったヌクレオチド、プライマー、プライマーダイマー、PCR試薬などは、スポットティング、ハイブリダイゼーション、S/N比などに影響すると考えられています。Wizard® MagneSil™ PCR Clean-Up Systemは、マイクロアレイ分析におけるPCR産物の精製などに適しており、エタノール沈殿法やフィルターを用いる方法に比べ、多くの利点があります。このシステムで使用するMagneSil™ 粒子は、スケール変更が自在で、Biomek® FXなどのワークステーションと組合わせれば96/384フォーマットの完全自動精製が可能です。

PCR産物の回収率

2種類の大腸菌株 (MG1655:K12およびO157:H7) ゲノムDNAを鋳型として、96種類のプライマーペアでPCRを行いました。PCR産物はWizard® MagneSil™ PCR Clean-Up SystemとBeckman Biomek® FXを組合わせて精製しました。シングルプレートプロトコルを用いた場合、96サンプルを30分間で精製しました。PCR産物の回収率は約80%を示し、FMBIO® フルオロイメジャーによるエチジウムブロマイドゲルスキャニングではプライマーやプライマーダイマーは観察されませんでした。(図1参照)

マイクロアレイハイブリダイゼーション

精製したPCR産物をスポットティングし、Cy®3またはCy®5で標識したcDNAでハイブリダイゼーションを行いました。この標識ターゲットはImProm-II™ Reverse Transcriptase (カタログ番号 A3802) で合成しました。このシステムを用いて精製したPCR産物で作製したアレイは均一なスポットとして観察され、2つの分離したマイクロアレイを用いたCy®3/Cy®5標識ターゲットのそれぞれのハイブリダイゼーションパターンは同様であり、一貫性と再現性を示しました。(図2参照)

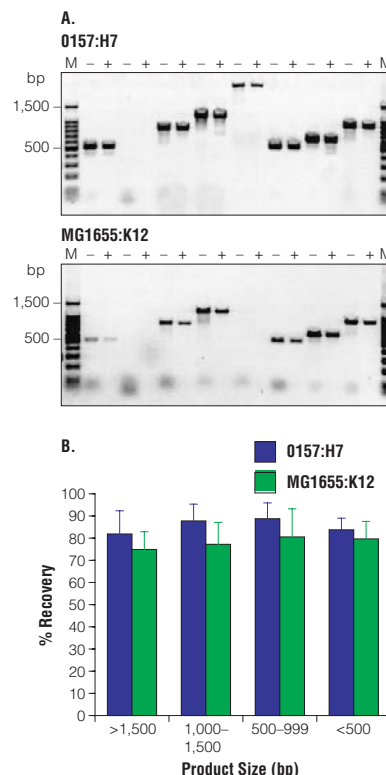


図1. PCR産物精製後の回収率

2種類の大腸菌株のゲノムDNAをPCRの鋳型として用いた。パネルA: Wizard® MagneSil™ PCR Clean-Up Systemで処理したPCR産物、精製前(-)、精製後(+)。レーンM: 100bp DNA Ladder (カタログ番号 G2101)。パネルB: 各大腸菌株1プレートからの%回収率。

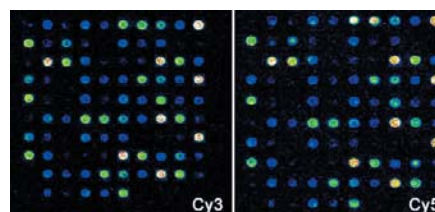


図2. Cy®3またはCy®5で蛍光標識した*E. coli*ターゲットによるハイブリダイゼーション後のアレイイメージ

*E. coli*ゲノムDNAを96種のユニークなプライマーペアで増幅した。精製したPCR産物はPoly-L-lysineコートスライドにスポットティングし、Cy®3およびCy®5で標識した*E. coli* cDNAでハイブリダイゼーションを行った。アレイのスキャンはPackard ScanArray® Instrumentを、分析にはQuantArray® Microarray Analysis Softwareを用いた。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Wizard® MagneSil™ PCR Clean-Up System	4X96ウェル分	A1930	35,000
	8X96ウェル分	A1931	60,000

Full Text www.promega.com/notes/80/9748_14/9748_14.pdf