

Wizard® SV および SV 96 Genomic DNA Purification System

By Terri Grunst, B.S., and Tracy Worzella, B.S., Promega Corporation

概要

本稿では、マウス尾、組織、培養細胞からゲノムDNAを精製する新しいWizard® SVおよびWizard® SV 96 Genomic DNA Purification Systemをご紹介します。96ウェルフォーマットのWizard® SV 96 Genomic DNA Purification Systemは、ハイスループットなゲノムDNA精製を行うことができます。マニュアルでも操作できる上にBeckman社のBiomek® 2000 ワークステーションなどの自動分注装置に搭載することも可能です。シングルカラムフォーマットのWizard® SV Genomic DNA Purification Systemは、簡便性と遠心操作または吸引操作が選べる柔軟性を持っています。このシステムは、約20分間でインタクトなゲノムDNAを精製することができます。ゲノムDNAは様々なサンプルタイプから精製でき、検知可能なクロスコンタミネーションは認められません。両システムで得られる良質のゲノムDNAの量は同等です。

Wizard® SVおよびSV 96 Genomic DNA Purification SystemはゲノムDNAの精製を簡便にするとともに処理スピード、実用性に優れたシステムです。

はじめに

ゲノムDNAの単離/精製は、多くの分子生物学プロトコルでキーとなるステップです。通常、ゲノムDNAは、細胞や組織サンプルをホモジナイズまたはタンパク質分解処理により機械的に破碎した後、フェノール抽出により精製されます。この操作は煩雑で時間もかかり、毒性を持つ有機溶媒も使用します。Wizard® SV およびWizard® SV 96 Genomic DNA Purification Systemは、簡単、迅速にゲノムDNAを精製でき、そのまま次のアプリケーションに使用することができます。

ハイスループットなゲノムDNA精製には、短時間で良質のDNAを精製し、各ウェルのサンプルがクロスコンタミネーションしないことが重要です。Wizard® SV 96 Systemはこれらのニーズを満たし、様々なサンプルタイプからのゲノムDNA精製が可能です。この96ウェルフォーマットでは、マルチチャンネルピペッターを用いたマニュアル法でもBiomek社のBeckman® 2000などの自動分注機による自動精製でも約1時間で完了します。

“SV” ゲノムDNA精製法

この方法の基本操作は、ライセートの調製、ゲノムDNAの捕捉、不純物の洗浄除去、精製DNAの溶出から成ります。図1ではWizard® SV 96 System、図2ではWizard® SV Systemの操作概要を示しています。マウス尾断片などの組織サンプルは、プロテイナーゼK（カタログ番号V3021、システムには含まれません）を用いて、55℃で一昼夜消化し、Wizard® SV Lysis bufferで溶解します。組織培養細胞の場合は、1XPBS（システムには含まれません）で洗浄し、Wizard® SV Lysis bufferで溶解します。ライセートはカラムに添加し、遠心または吸引によりメンブレンを通過させます。数回洗浄した後、Nuclease-Free Waterで溶出します。精製されたゲノムDNAは、SV Systemでは1.5mlマイクロ遠心チューブに、SV 96 Systemではディープウェルプレートにそれぞれ回収されます。SV 96 Systemでは、便利な吸引装置を使用するので、内部に溜まった洗浄排液を取り出すために、DNAの捕捉、洗浄ステップで吸引装置を分解する必要がなく、外部の吸引トラップに直接排出されます。

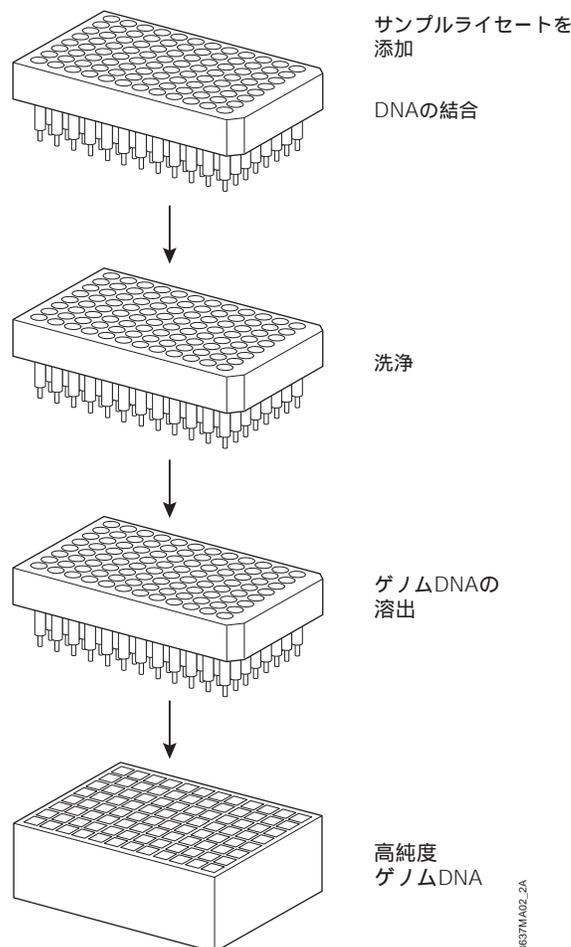


図1. Wizard® SV 96 Genomic DNA Purification Systemの操作概要

サンプル分析：精製したゲノムDNAの収量と純度

Wizard® SVおよびSV 96 Systemを用いてマウス尾や組織培養細胞から精製したゲノムDNAは、260/280nmの吸光度を求め、収量、純度を算出しました。良質のゲノムDNAは、通常 A_{260}/A_{280} 比1.7~2.0の値を示します。図3では、SV Systemの遠心法、吸引法およびSV 96 Systemを用いて精製したマウス尾からのゲノムDNA平均収量、純度を示しました。表1では、20mgのマウス尾、マウス肝臓、マウス心臓およびマウス脳と組織培養細胞からの平均ゲノムDNA収量を示しました。

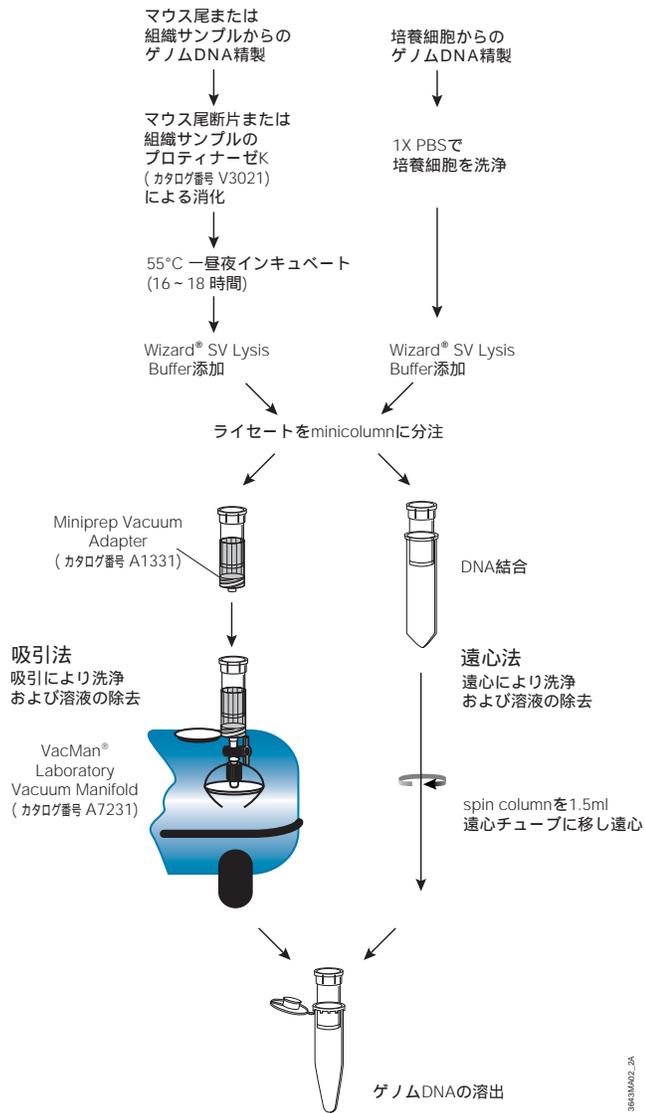


図2. Wizard® SV Genomic DNA Purification Systemでの遠心法と吸引法の操作概要

サンプル分析：ゲノムDNAのクオリティー

SV Systemを用いて組織培養細胞またはマウス組織から精製したゲノムDNAのクオリティーは、PCRにより評価しました。1 × 10⁵個のHeLa細胞から精製したゲノムDNA 1μlを用いて、Factor V特異的プライマーでPCRを行いました（図4）。マウス肝臓、心臓、脳の各組織20mgから精製したゲノムDNA 1μlは、マウス特異的IL-1プライマーを用いたPCRで増幅しました（図5）。

SV 96 Systemで精製したゲノムDNAのクオリティーはSV Systemと同様の方法で評価しました。マウス尾または組織培養細胞から調製したゲノムDNA 1μlをPCRにより増幅しました。マウス尾サンプルからの精製DNAはIL-1の増幅で、HeLa細胞からの精製DNAはFactor Vの増幅により評価しました（図6）。“SV”で精製した全てのゲノムDNAサンプルはPCR増幅の鋳型として優れていました。

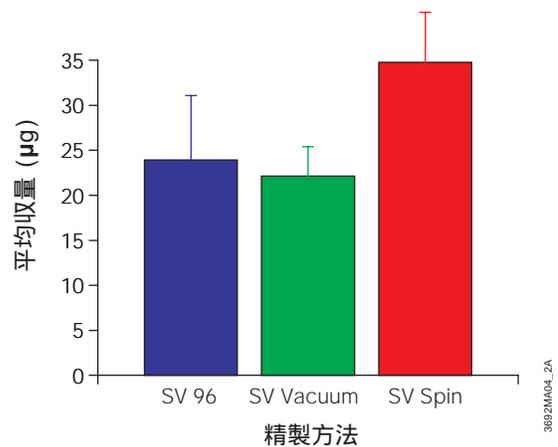


図3. Wizard® SV と Wizard® SV 96 Genomic DNA Purification Systemの収量比較

マウス尾 20mgからのゲノムDNAの平均収量。平均A₂₆₀/A₂₈₀比は、SV 96, 1.7 ± 0.08; SV 吸引法, 1.7 ± 0.14; SV遠心法, 1.7 ± 0.14

表1. Wizard® SVおよびSV 96 Genomic DNA Purification Systemを用いた様々な組織からの平均ゲノムDNA収量

サンプルタイプ	スタート量	平均収量
マウス尾	20mg	20μg
マウス肝臓	20mg	15μg
マウス心臓	20mg	10μg
マウス脳	20mg	6μg
CHO細胞	1 × 10 ⁶ 個	5μg
NIH3T3細胞	1 × 10 ⁶ 個	9μg
293 Cells	1 × 10 ⁶ 個	8μg

ゲノムDNAの自動精製

SV 96 SystemとBeckman社Biomek® 2000を用い、組織培養細胞およびマウス尾サンプルからゲノムDNAを精製しました。Biomek® 2000のデッキをセットアップ（図7）してから、プログラム（表2）を作動させ、96サンプル1プレート分までを約1時間で精製しました。

この自動ゲノムDNA精製システムで注意すべき点は、粘性の高いライセートを処理する場合です。細胞残渣を多く含むライセートは、SV 96 Binding Plateへの添加が難しく、プレートを目詰まりさせることもあります。この場合、遠心操作を新たに加え、ライセートに含まれる未消化物を沈殿させることにより目詰まりを防ぐことができます。

図8には、Beckman社Biomek® 2000を用いたマウス尾20mg × 96サンプルからの自動精製によるゲノムDNAの標準的な収量および純度を示しました。この方法により精製したDNAのA₂₆₀/A₂₈₀比は通常1.7-2.0内であり、このハイスループット用プロトコルにより良質のゲノムDNAが得られることを示しました。

SV 96 Systemのクロスコンタミネーションテストとして、96ウェルプレートにマウス尾サンプルと水（陰性コントロール）を交互に分注したのを用い、マニュアル法（データ未掲載）またはBeckman社のBiomek® 2000による自動化法によりゲノムDNAを精製しました。サンプル間のクロスコンタミネーションはマウスIL-1 DNAの増幅により判定しました（図9）。

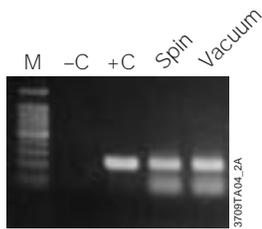


図4. Wizard® SV Genomic Systemにより精製したDNAのPCR増幅

DNAは 1×10^6 個のHeLa細胞から精製し、各精製ゲノムDNA 1 μ gを用いてFactor V特異的プライマーでPCRを行った (250bp産物)。レーン: -C, 陰性コントロール (DNA無し); +C, 陽性コントロール, Human Genomic DNA (カタログ番号G3041); Spin, 遠心法で精製したゲノムDNA; Vacuum, 吸引法で精製したゲノムDNA。サーマルサイクリングの条件: 95 , 3分間 1サイクル; 95 , 30秒間 60 , 1分間 70 , 1分間を35サイクル; 最終伸張 70 , 7分間。各PCR産物 10 μ lは、2%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可視化した。

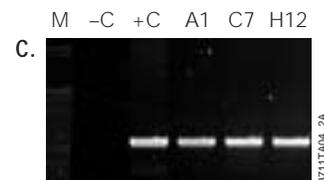
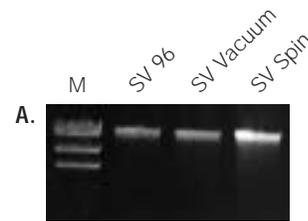


図6. 精製したゲノムDNAの解析

パネルA: 組織培養細胞からのゲノムDNA精製。 5×10^6 個のHeLa細胞から精製したゲノムDNA 10 μ lを1%ゲルを用いた電気泳動により分析し、エチジウムブロマイドにより染色した。パネルB, C: HeLa細胞およびマウス尾から精製したゲノムDNAをFactor VプライマーでPCR増幅した。パネルB: 予想されるFactor V増幅産物のサイズは約250bp。レーンM, 100bp DNA Marker; レーン-C, 陰性コントロール; レーン+C, 陽性コントロール; レーンA1, D6, H12, 各ウェル番号のFactor V増幅産物。パネルC: PCR産物を1.5%アガロースで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により可視化した。マウス尾から精製したゲノムDNAをIL-1 プライマーで増幅したPCR産物の予想サイズは約1.2kb。レーンM, 1kb DNA Marker; レーン-C, 陰性コントロール; レーン+C, 陽性コントロール; レーンA1, C7, H12, 各ウェル番号のIL-1 増幅産物。

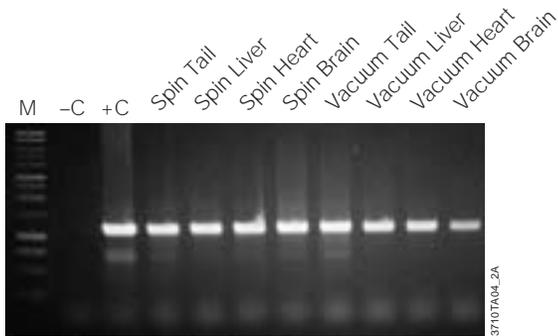


図5. 様々な組織から精製したゲノムDNAの増幅

精製したゲノムDNA 1 μ lをPCR Master Mix (カタログ番号 M7502) およびマウス特異的IL-1 プライマー(1.2kb 産物) を用いて増幅した。Mouse Genomic DNA (カタログ番号 G3091; +C) を用いた反応およびDNAを含まない反応 (-C) をそれぞれ陽性および陰性コントロールとした。サーマルサイクリングの条件: 95 , 3分間 1サイクル; 95 , 30秒間 60 , 1分間 70 , 1.5分間を30サイクル; 最終伸張 70 , 7分間; 4 ソーク。各PCR産物10 μ lは、1%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可視化した。図中の“Spin”および“Vacuum”はゲノムDNA精製で使用したプロトコルを意味します。

図9では、水の入ったウェルに検出可能なDNAの混入 (クロスコンタミネーション) は認められませんでした。SV 96 SystemおよびBeckman Biomek® 2000を組合わせた自動化ゲノムDNA精製により、23kb以上のインタクトなゲノムDNAを精製することができました。組織培養細胞から精製したゲノムDNAにRNAの混入が見られる場合は、RNase溶液1 μ lを溶出したDNAに加えるか、溶出用のNucleas-Free Waterに混ぜておくことにより防ぐことができます。精製したゲノムDNAは、PCRで増幅することができ、多くのアプリケーションに適しています。96サンプルの処理は、マニュアル操作のない自動化システムにより約1時間で完了します。複数のサンプルタイプから精製可能で、クロスコンタミネーションも認められません。

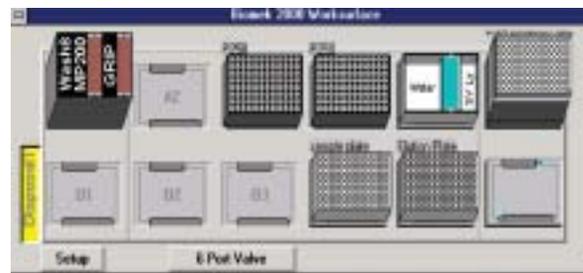


図7. ゲノムDNA精製用 Biomek® 2000 初期デッキレイアウト

プロトコルに必要なツールは、Wash8, MP200およびグリッパー。すべてポジションA1に設置。ポジションA2, B1, B2, B3は空きスペース。ポジションA3およびA4はP250チップボックス。ポジションA5にはNuclease-Free WaterおよびWizard® SV Lysis Bufferの入ったリザーバー。ライセートの入ったサンプルプレートはポジションB4。(ここで示すのは、マウス尾からのゲノムDNA精製用のサンプルプレート: 組織をプロテイナーゼKで一晩消化した組織ライセートをディープウェルに入れたもの)。溶出用のディープウェルプレートはポジションB5。ポジションA6には下からBeckman vacuum manifold, 65mm collar, SV 96 Binding Plateを重ねた。ポジションB6には、ゲノムDNAを溶出するためにバキュームマニホールドを組立てまたは分解する間に65mm collarとSV 96 Binding Plateのセットを静置するためのcollar holderを設置。加えて、Biomek® 2000 wash unitのポート2をSV 96 Wash Solutionの入ったボトルに接続する。

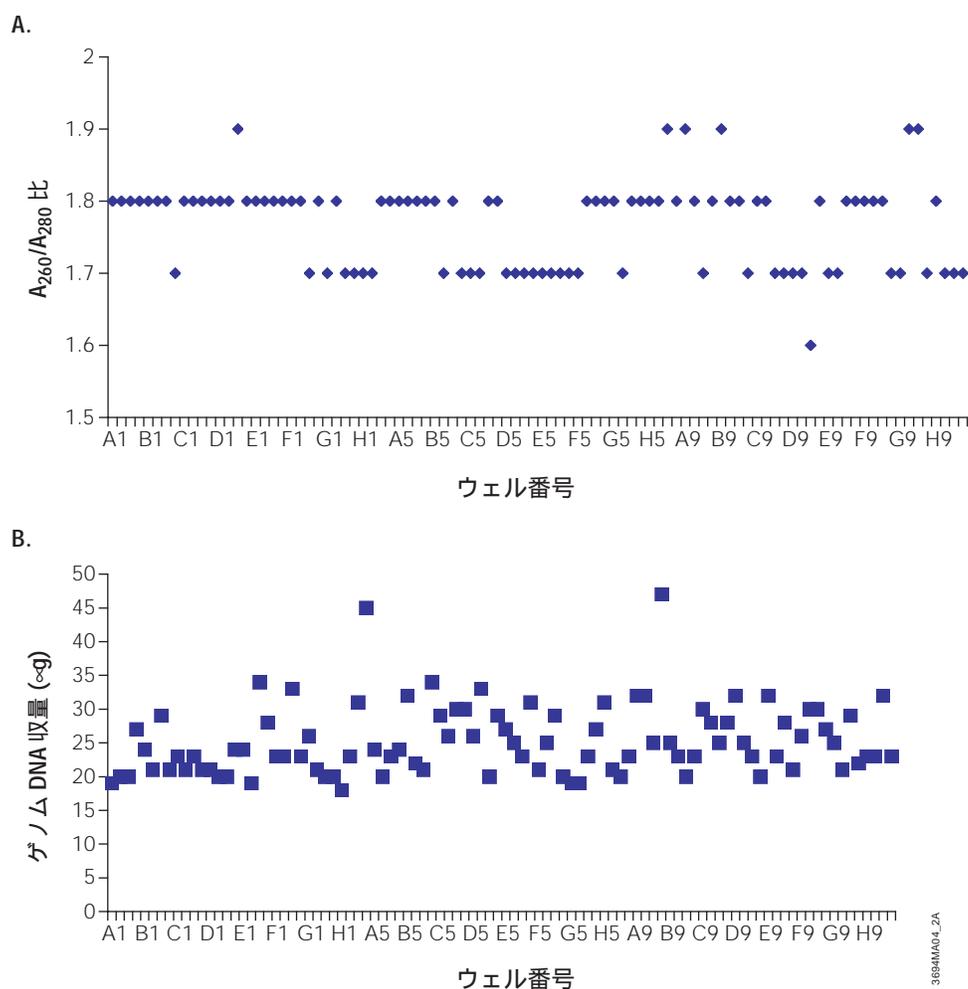


図8. Wizard® SV 96 Genomic DNA Purification Systemを用いてマウス尾 20mgサンプルから精製したDNAの収量と純度
純度は A_{260}/A_{280} の比から、収量は吸光度 (260nm) で測定した。

表2. Biomek® 2000 によるゲノムDNA精製プログラム

- ステップ1. Biomek® 2000によるサンプルへのWizard® SV Lysis Buffer添加。組織培養細胞からのゲノムDNA精製の場合、Wizard® SV Lysis Bufferはデッキ上のサンプルプレートポジションに配置した培養プレート中の附着細胞に直接添加。マウス尾などの組織細胞の場合、プロテイナーゼKで一昼夜消化したサンプルの入ったディープウェルプレート (製品には含まれません) をデッキ上のサンプルプレートポジションに置き、Wizard® SV Lysis Bufferを添加。
- ステップ2. Biomek® 2000により、96ウェルサンプルプレートからサンプルライセートをSV 96 Binding Plateに分注。サンプルライセートは吸引によりプレートを通過し、ゲノムDNAはSV 96 Binding Plateに結合。
- ステップ3. Wash 8 Toolを用いたSV Wash Solutionによる洗浄を3回行う。
- ステップ4. 残ったエタノールを除去するために吸引で簡単にプレートを乾燥させる。
- ステップ5. 精製ゲノムDNAを溶出するステップでは、吸引マニホールドはGripper toolにより一度分解され、溶出用のディープウェルプレートをSV 96 Binding Plateの下に配置して再度組み立てる。
- ステップ6. SV 96 Binding Plateから精製ゲノムDNAを溶出する際には、培養細胞から精製する場合はNuclease-Free Water 250 μ l、マウス尾などの組織サンプルから精製する場合は、Nuclease-Free Water 500 μ lで溶出。

結論

Wizard® SVおよびSV 96 Genomic DNA Purification Systemは、良質なゲノムDNAをロースルーブットからハイスルーブットまでのフォーマットで精製することができます。これらのユーザーにやさしいシステムは、PCRにそのまま使用できるゲノムDNAを安定して供給します。また、この柔軟性の高さにより、様々なサンプルタイプからゲノムDNAを精製することができます。

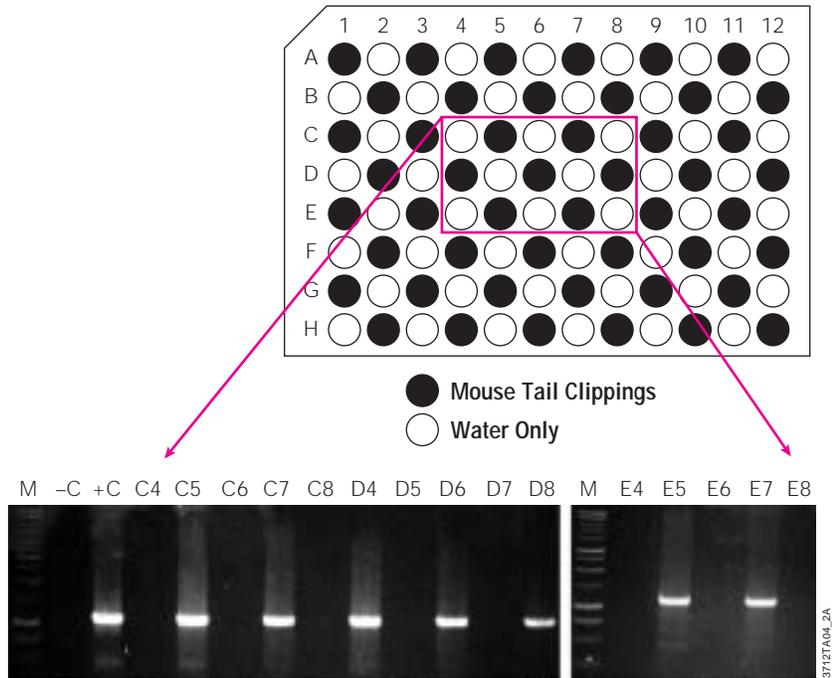


図9. クロスコンタミネーションアッセイ 96ウェルプレートにマウス尾サンプルまたは水を交互に分注し、ゲノムDNAを精製した。精製後、各ウェルから精製DNA1μlを鋳型として、マウスIL-1 特異的プライマーで増幅した。10μlのPCR産物を1.5%アガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイドで染色した。バンドのサイズは約1.2kb。水をサンプルとしたものからはPCR産物は検出されなかった。PCRプロトコル：95℃、3分間 1サイクル；95℃、30秒 60℃、1分間 70℃、1.5分間を30サイクル；70℃、7分間 最終伸張；4℃、ソーク。

製品案内

製品名	サイズ	カタログ番号	価格(¥)
Wizard® SV Genomic DNA Purification System	50回分	A2360	18,000
	250回分	A2361	70,000
Wizard® SV 96 Genomic DNA Purification System	1 × 96ウェル分	A2370	32,000
	4 × 96ウェル分	A2371	119,000