

Nucleic acid isolation

遠心分離不要のプラスミドDNAの抽出： 磁気ビーズを用いたミニプレップ抽出法の比較

はじめに

SARS-CoV-2ウイルスに対するmRNAワクチンの開発に伴い、プラスミドDNAの精製に近年注目が向けられています。プラスミドDNA（以下pDNA）は、幅広いウイルス病理学的な応用はもちろんのこと、さまざまな細胞・遺伝子治療（CGT）製品の開発パイプラインに不可欠な存在です。大規模生産に先立つ非臨床開発段階で高品質のpDNAを抽出・精製できなければ、革新的医療の成功は望めません。

ワクチンやCGTの非臨床開発では、プラスミド抽出工程で何度も必要となる遠心分離の回数が、プラスミドからのpDNA精製プロセスの律速となります。遠心分離は宿主細胞ゲノムDNAからのpDNA分離によく使われる技術ですが、開発初期段階のワークフローにおける処理スピードの停滞をまねく大きなボトルネックとなっています。遠心分離操作を省略できれば、このような表からは見えにくい隠れたボトルネックを解消して、一連のハイスループット・スクリーニングなどで高い処理効率を実現できると期待できます。

上記背景を念頭に、pDNA分離・精製用の磁気ビーズベースのミニプレップ抽出キット3種の抽出結果を比較してみました。また、手動抽出と自動抽出についても詳しくみていきたいと思います。

• Invitrogen™ ChargeSwitch™ Plasmid ER Mini Kit (製品番号: CS10100)

- 細菌培養物のペレット化やライセートの上清を得るために遠心分離が必要
- Thermo Scientific™ KingFisher™システムや自動リキッドハンドリングシステムを用いて自動化できる
- Invitrogen™ ChargeSwitch™磁気ビーズを使用してpDNAを即座に溶出
- 1～5 mLの細菌培養ペレットから精製可能
- エンドトキシン濃度 50 EU/μg pDNA以下
- 50～100 μLの溶出バッファー*から最大20 μgのpDNAを分離

* ChargeSwitch磁気ビーズキット（製品番号: CS10201およびCS10100）は、収量増加のためのスケールアップが可能です。通常、各種試薬は比例的にスケールアップできます（最適化の必要性は最小限）。



• Invitrogen™ ChargeSwitch™ NoSpin Plasmid Micro Kit (製品番号: CS10201)

- ハイスループットの自動化ワークフローに適した遠心分離不要のミニプレップキット
- 細菌培養ペレットを必要としない
- KingFisherシステムや自動リキッドハンドリングシステムを用いて自動化できる
- Invitrogen™ ChargeSwitch™ MagnaClear™ビーズの使用により、培養物やライセート上清から細菌細胞を直接捕捉できる他、バッファーによる表面電荷を介してpDNAを即座に溶出
- 1 mLの細菌培養液から精製可能
- エンドトキシン濃度 100 EU/μg pDNA以下
- 20～100 μLの溶出バッファー*から最大5 μgのpDNAを分離

ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kitと他社の磁気ビーズキットは、細菌培養液から直接pDNAを分離できるキットです。前者のChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kitは、遠心分離を行わずに細菌細胞を凝集させてペレットを形成できるInvitrogen™ ChargeSwitch™ MagnaClear™テクノロジーを採用しています。これらのキットの他に、遠心分離が必要な「従来型」の磁気ビーズキットであるChargeSwitch Plasmid ER Mini Kitを比較基準として評価対象に含めました。

今回の評価では、製造業者提供の各キット取扱説明書に従ってpDNAを手動操作で抽出したのに加えて、ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro KitとThermo Scientific™ KingFisher™ Flexシステムを併用した自動抽出も行いました。

さらに、ChargeSwitch Plasmid ER Mini Kitと他社の磁気ビーズキット双方におけるエンドトキシン濃度を調べました。また、これら3キットによる分離pDNAの主要アイソフォームを確認して、核酸安定性を評価しました。

材料・方法

細菌培養

Invitrogen™ OneShot™ TOP10 Chemically Competent *E.coli* (製品番号:C404003)を平板画線法で一晩培養させたプレートから1コロニーをアンピシリン含有Luria-Bertani (LB) 培地に播種し、37°C、225 rpmで8時間振とう培養してスターターを得ました。ChargeSwitchキットを用いた抽出では、このスターター200 µLを200 mLのLB培地に播種し、激しく振とうさせながら37°Cで12～16時間振とう培養しました。他社の磁気ビーズキットを用いた抽出では、本キットの取扱マニュアルに従って、750 mLのアスピリン含有LB培地を入れた96ウェルブロックの各ウェルにスターターを播種して、37°C、225 rpmで24時間振とう培養しました。細菌培養液の光学濃度(OD_{600 nm})は最終的に3.8に達しました(Thermo Scientific™ NanoDrop™微量分光光度計で測定)。

手動抽出

方法—pDNAの分離・精製

評価・校正対象キットのユーザーガイドに従って試薬を調製し(操作には手持ち式ピペットを使用)、ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro KitやChargeSwitch Plasmid ER Mini Kitを用いた抽出では1 mLの細菌培養液、他社の磁気ビーズキットを用いた抽出では750 µLの細菌培養液からpDNAを分離しました。各キットの処理サンプル数(n)は8としました。ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro KitやChargeSwitch Plasmid ER Mini Kitによる抽出処理には、1.5 mLのApplied Biosystems™ Nonstick RNase-Free Microfuge Tubes (製品番号:AM12450)を用いてInvitrogen™ DynaMag™ -2 Magnetで磁気によって分離しました。他社の磁気ビーズキットを用いた抽出処理には、キットに含まれるプレート(消耗品)とApplied Biosystems™ Pharma Magnetic Stand-96 (製品番号:A31543)を用いまし

た。ChargeSwitchキットには100 µL、他社の磁気ビーズキットには40 µLの溶出液を調製しました。

pDNA解析

NanoDrop微量分光光度計を用いて、抽出サンプルの核酸量(A₂₆₀)と純度(A₂₆₀/A₂₈₀およびA₂₆₀/A₂₃₀)を解析しました。アガロースゲル電気泳動によって、pDNAアイソフォーム(スーパーコイル状、ニック入り、線状、および一本鎖pDNA)を視覚的に評価しました。ChargeSwitch Plasmid ER Mini Kitと他社の磁気ビーズキットはともにエンドトキシン低減をうたっていることから、EndoSafe™ Limulus Amebocyte Lysate (LAL) システム(Charles River Laboratories、製品番号:PTS201)を用いて、これらのキットで精製したpDNAのエンドトキシン濃度を定量しました。

結果

pDNAの収量

各キットのユーザーマニュアルに記載されているpDNA収量は以下のとおりです。

- 他社の磁気ビーズキット: 最大10 µg
- ChargeSwitch Plasmid ER Mini Kit: 最大20 µg
- ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kit: 最大5 µg
- 今回の評価でpDNAの平均収量が最も高かったのはChargeSwitch Plasmid ER Mini Kit (10.7 µg)で、ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kitは平均7.8 µg、他社の磁気ビーズキットは平均5.7 µgでした。標準偏差(SD)の傾向もこれと同じで、ChargeSwitch Plasmid ER Mini KitのSDが0.25と最も低く、ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kit (0.45)、他社の磁気ビーズキット (0.76)と続きました(図1)。

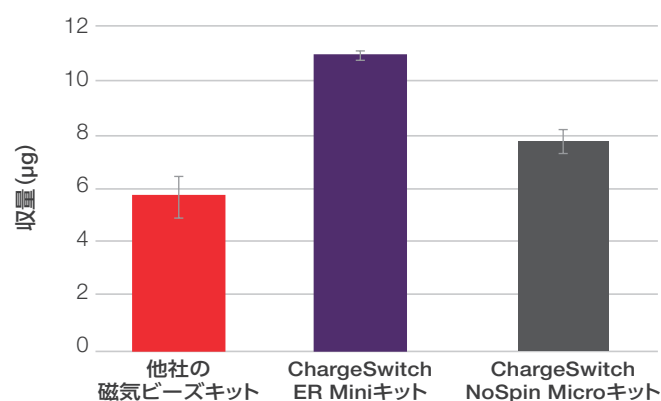


図1. 他社の磁気ビーズキット、ChargeSwitch Plasmid ER Mini Kit、またはChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kitを用いて手動抽出したpDNAの平均収量

続けて、遠心を行わないペレットフリーの磁気ビーズ抽出法2種類 (ChargeSwitch NoSpinと他の磁気ビーズ) を用いて同じ実験を繰り返し、両者を直接比較しました。この反復実験の目的は、(1) ChargeSwitch NoSpin キットはエンドトキシンフリーではないけれども他社の磁気ビーズキットよりも優れた収量が得られること、(2) 他社の磁気ビーズキットと比べてChargeSwitch NoSpin キットは高収量に一貫性があることを実証することにあります。まったく同じ手法を用いて他社の磁気ビーズキット (n=8) とChargeSwitch NoSpin キット (n=8) による再抽出を実施してpDNA収量を評価したところ、ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kit (7.2 μ g) は他社の磁気ビーズキット (4.1 μ g) のほぼ2倍のpDNAを精製できました (図2)。

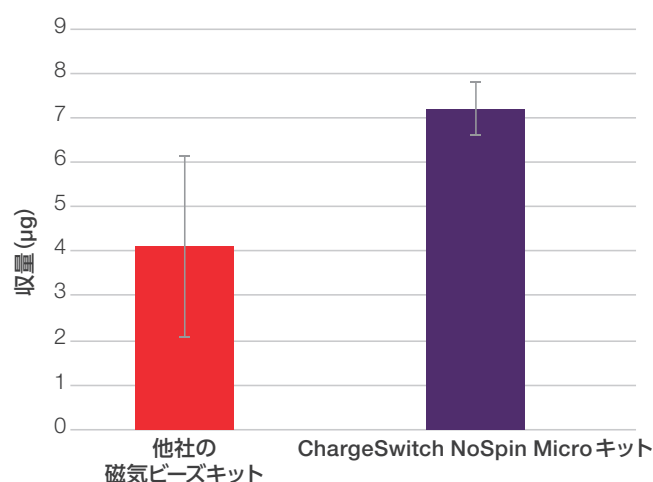


図2. 他社の磁気ビーズキットまたはChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kitを用いて手動抽出したpDNAの平均収量 pDNAの平均収量は、ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kitで7.2 μ g (SD = 0.6)、他社の磁気ビーズキットで4.1 μ g (SD = 2) でした。

pDNAの純度

2回目の抽出実験から得られたサンプルの吸光度の比 (A_{260}/A_{280} および A_{260}/A_{230}) を基に純度を測定し (図2、各キットn=8)、図3にそれらの平均値を示します。不純物が全く混在していない状態におけるdsDNAの A_{260}/A_{280} は1.85~1.88、RNAの A_{260}/A_{280} は約2.1ですが、 A_{260}/A_{280} がこれらの値より低くなると不純タンパク質のコンタミネーションが示唆されます。 A_{260}/A_{230} は、230 nmに吸光ピークをもつ不純物 (カオトロピック塩や非イオン性界面活性剤、タンパク質、フェノールなど) を高感度で検出できる指標です。一般的に、DNAサンプルの A_{260}/A_{280} と A_{260}/A_{230} が1.8を上回れば「不純物なし (クリーン)」とみなされ、ほとんどのダウンストリーム・ワークフローに適していると判断されます。

他社の磁気ビーズキットによる抽出サンプル (n=8) の平均 A_{260}/A_{280} は1.79 (SD=0.039) で、この純度基準 (1.8) に僅かに達しませんでした。一方、ChargeSwitch NoSpin Microキットによる抽出サンプル (n=8) の平均 A_{260}/A_{280} は1.93 (SD=0.044) と1.8を上回っており、他社の磁気ビーズキットの抽出サンプルよりも多くの二本鎖pDNAが含まれていることが示唆されます。また、他社の磁気ビーズキット抽出サンプルの平均 A_{260}/A_{230} は0.98 (SD=0.073) であり、バッファー中の残留有機物の影響が考えられます。対してChargeSwitch NoSpin Microキット抽出サンプルの平均 A_{260}/A_{230} は1.97 (SD=0.197) と、本キットによる処理サンプルが一般的なダウンストリーム・ワークフローの純度要件を満たすことが示されました。

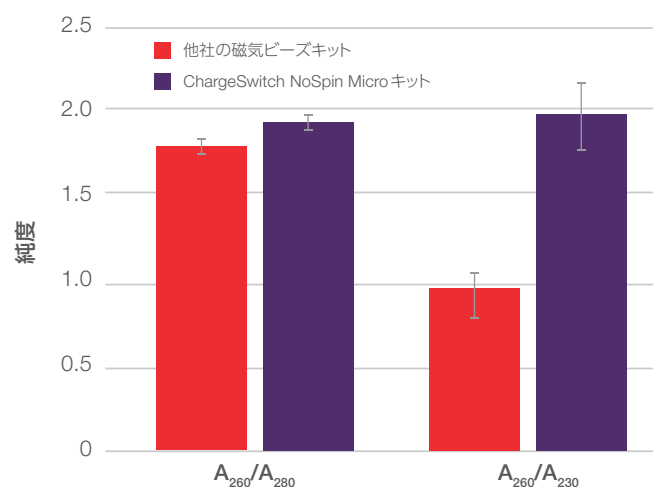


図3. 手動抽出法から得られた平均純度 他社の磁気ビーズキットを用いた抽出サンプルの平均 A_{260}/A_{280} 比は1.79 (SD=0.039)、ChargeSwitch NoSpinキットを用いた抽出サンプルの平均 A_{260}/A_{280} 比は1.93 (SD=0.044) であり、ChargeSwitch NoSpinキットからの抽出サンプル中に十分なpDNAが存在することが明確に示されました。他社の磁気ビーズキット抽出サンプルの平均 A_{260}/A_{230} 比は0.98 (SD=0.073) と**、230 nmの光を吸収する不純物のコンタミネーションが示唆されますが、ChargeSwitch NoSpinキット抽出サンプルの平均 A_{260}/A_{230} 比は1.97 (SD=0.197) でした。

**リポ多糖 (LPS) 1 ng = 1.8 EU/mg

エンドトキシン濃度

エンドトキシン濃度をEndoSafe LAL 検査システムを用いて測定しました。「endo-free (エンドトキシフリー)」とみなされるエンドトキシン濃度の業界基準は0.1 EU/μgであり、通常、このレベルを核酸導入に理想的なアドバンスト (上級) トランスフェクショングレードとして扱います。エンドトキシン濃度が0.1～1.0 EU/μgの範囲であれば核酸導入に使用可能なトランスフェクショングレードの「low-endo (低エンドトキシン)」, エンドトキシン濃度が1.0 EU/μgを超えると分子生物学的研究に使用可能なモレキュラーグレードとみなされます。

ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kitはエンドトキシン低減をうたっていません[†]。つまり、抽出サンプルには1.0 EU/μg以上のエンドトキシンが含まれていると推定されることから、EndoSafe LAL システムによる評価は行いませんでした。一方、ChargeSwitch Plasmid ER Mini Kitは、1回の精製処理につき50 EU/μg未満のエンドトキシン低減を主張しています。他社の磁気ビーズキットは「エンドトキシフリー」の調製キットをうたい文句としていますが、製品パンフレットには1回の精製処理につき50 EU/μg以下のエンドトキシン低減が期待できると記載されています。

ChargeSwitch Plasmid ER Mini Kit抽出サンプルの平均エンドトキシン濃度は0.51 EU/μgであり、エンドトキシン低減抽出法といえる基準を満たしています (n=2、表1)。対して、他社の磁気ビーズキット抽出サンプルの平均エンドトキシン濃度は114.45 EU/μgであり、エンドトキシフリーのうたい文句もキット規格 (エンドトキシン濃度50 EU/μg以下) も立証できませんでした (n=2、表1)。今回の評価結果からは、他社の磁気ビーズキットはモレキュラーグレードの精製キットと呼ぶ方が適しているように思われます。

表1. ChargeSwitch Plasmid ER Mini Kitおよび他社の磁気ビーズキットを用いた抽出サンプルの平均エンドトキシン濃度

キット	サンプル番号	EU/μg (各サンプル)	EU/μg (平均)
ChargeSwitch Plasmid ER Mini Kit	サンプル1	<0.09	<0.51
	サンプル2	<0.93	
他社の磁気ビーズキット	サンプル1	<131.07	<114.45
	サンプル2	<97.82	

pDNA アイソフォーム

最も理想的なpDNA アイソフォームは、安定性に優れて良好な抗原性を示すスーパーコイル状のpDNAです。スーパーコイル形状のDNAは細胞内に移行しやすく、より多くのコロニー (形質転換体) が形成されます。他のDNA形状には、ニックが入って弛緩 (非スーパーコイル化) した開環状DNAや、DNAの両鎖が同一箇所もしくはほぼ同一箇所で切断された線状DNAがあります。宿主細胞のゲノムDNAや、ニック入りpDNA、線状pDNA、または一本鎖pDNA (sspDNA) の存在は、ダウンストリーム・ワークフローに悪影響を及ぼし得る精製不純物とみなされるので、pDNA アイソフォームの混在を評価するために、各キット8サンプルを対象に1% アガロースゲル電気泳動を行いました (図4)。その結果、他社の磁気ビーズキットによる抽出サンプル中のpDNAはスーパーコイル状のものが50%以下にすぎず、残りはゲノムDNA、ニック入り、または一本鎖でした。対して、ChargeSwitch NoSpin キットやChargeSwitch Plasmid ERキットを用いた抽出サンプルでは、50%超のサンプルの主要アイソフォームがスーパーコイル状pDNAであり、他にはニック入りDNAかゲノムDNAが少量確認されただけでした。

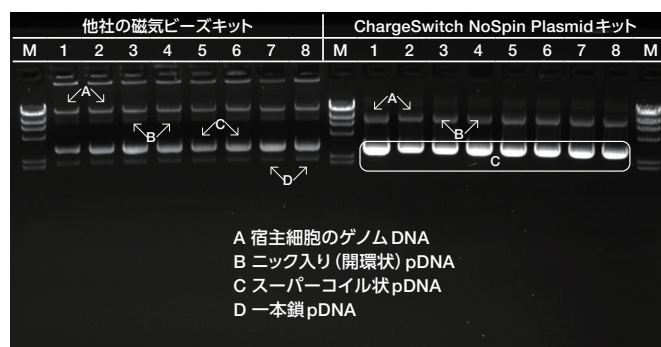


図4. 1% アガロースゲル電気泳動によるpDNA アイソフォームの評価 他社の磁気ビーズキットによる抽出サンプルにはゲノムDNA、ニック入りpDNA、スーパーコイル状pDNA、および一本鎖pDNAが含まれていました。ChargeSwitch NoSpin キットやChargeSwitch Plasmid ERキットによる抽出サンプルの主要アイソフォームはスーパーコイル状pDNAでした。

[†] 低エンドトキシン濃度が望まれる処理にChargeSwitchキットを用いる場合はエンドトキシン除去剤を併用することもできますが、サーモフィッシャーサイエントフィックは除去剤添加に関する検証試験を行っていません。

自動抽出

方法—pDNAの分離・精製

ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kitによる自動抽出を、KingFisher Flex システム（製品番号：5400630）を用いて実施しました。自動抽出では7種のプレート进行处理しました（充填した試薬、作成したプレートのタイプ、ラベル名を表2に示す）。まず、「プラスミドサンプルプレート」とラベル表示した Thermo Scientific™ KingFisher™ 96ディープウェル (DW) プレートの5ウェルにLB培地で培養した細菌培養液 1 mLを充填した後、ボルテックスで十分に分散させた ChargeSwitch MagnaClearビーズ 30 μ Lを添加しました。次に、2枚の洗浄済み Thermo Scientific™ KingFisher™ 96チップコームを、「チップコームプレート1」および「チップコームプレート2」とラベルした2枚の空の Thermo Scientific™ KingFisher™ 96KF プレートに挿入しました。さらに、2枚の KingFisher 96DW プレートに「洗浄プレート1」と「洗浄プレート2」のラベルを付け、100 μ L の ChargeSwitch 溶出バッファを充填した KingFisher 96 標準プレート1枚に「溶出プレート」のラベルを付けました。これらのプレートを KingFisher Flex システムにセットし、「CS10201_CS_NoSpin_Flex_Automated.bdz」プロトコルを実行しました。今回の実験ではリキッドハンドラー（自動液

体処理システム）を使用できなかったため、「CS10201_CS_NoSpin_Flex_Automated.bdz」プロトコルを編集してユーザーによる一時停止を2回設定し、各ウェルに150 μ Lの冷却した Invitrogen™ ChargeSwitch™ 沈殿バッファと30 μ L の ChargeSwitch 磁気ビーズを手動で追加できるようにしました。

比較対照として、ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kitを用いた同サンプル数の手動抽出をユーザーガイドどおりに実施しました。

NanoDrop 微量分光光度計を用いて、ChargeSwitch NoSpin キットを用いた抽出サンプル（手動抽出サンプル、ならびに KingFisher Flex システムによる自動抽出サンプル）の収分量 (A_{260}) と純度 (A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230}) を測定しました。また、1% ゲル電気泳動を行って、自動抽出および手動抽出サンプルそれぞれに含まれる pDNA アイソフォームを視覚的に評価しました。ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kitは「低エンドトキシン」も「エンドトキシンフリー」もうたっていないことから、エンドトキシン濃度は測定しませんでした。

表2. ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro KitとKingFisher Flex システムを用いた自動抽出に必要なプレートおよび試薬

プレート番号	プレート名	プレートの種類	試薬等	各ウェルの容量
1	プラスミドサンプルプレート	KingFisher 96DW プレート	LB 培地で一晚培養した細菌培養物	1 mL
			ChargeSwitch MagnaClearビーズ	30 μ L
2	プラスミド処理プレート	KingFisher 96DW プレート	ChargeSwitch再懸濁バッファ (R4) および ChargeSwitch RNase A	150 μ L
			ChargeSwitch 溶解バッファ (L9)	150 μ L
			ChargeSwitch 沈殿バッファ (N5) (手動もしくは自動分注システムで添加)	150 μ L
			ChargeSwitch 磁気ビーズ (手動もしくは自動分注システムで添加)	30 μ L
3	チップコームプレート1	KingFisher 96KF プレート	空プレートにチップコーム (96) を挿入	—
4	洗浄プレート1	KingFisher 96DW プレート	ChargeSwitch 洗浄バッファ (W11)	900 μ L
5	洗浄プレート2	KingFisher 96DW プレート	ChargeSwitch 洗浄バッファ (W12)	900 μ L
6	溶出プレート	KingFisher 96KF プレート	ChargeSwitch 溶出バッファ (E5)	100 μ L
7	チップコームプレート2	KingFisher 96KF プレート	空プレートにチップコーム (96) を挿入	—

結果

pDNA 収量—自動抽出と手動抽出の比較

ChargeSwitch NoSpin キットと KingFisher Flex システムを用いた自動抽出サンプルの pDNA 収量は、手動抽出サンプルと比較して平均して 2.9 倍増加しました (図 5)。ChargeSwitch NoSpin 抽出サンプルの pDNA 平均収量は、手動抽出サンプルが 4.5 μg であったのに対して自動抽出サンプルでは 13.2 μg でした ($n=5$)。

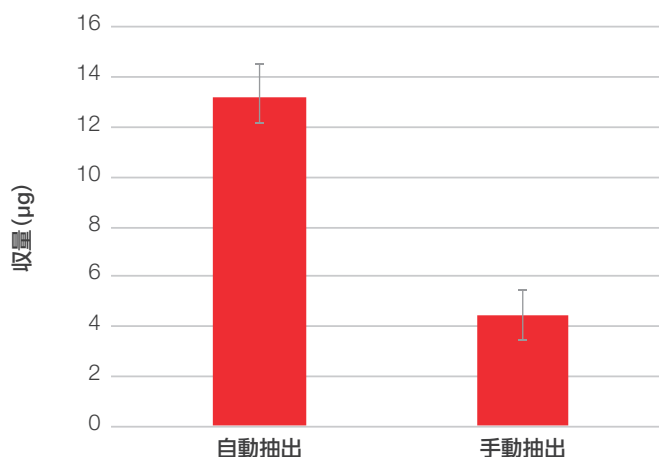


図 5. ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kit による自動抽出および手動抽出サンプルにおける pDNA の平均収量

純度—自動抽出と手動抽出の比較

ChargeSwitch NoSpin Plasmid キットを用いた手動抽出サンプルおよび自動抽出サンプルの A_{260}/A_{280} と A_{260}/A_{230} を測定しました (図 6)。 A_{260}/A_{280} は両者とも一様に 1.8 を上回っており、dsDNA が両サンプル中の主要成分であることが示されました。 A_{260}/A_{230} は自動抽出サンプルの方が手動抽出サンプルよりも若干良好でしたが、どちらの抽出方法も 1.8 を上回ったことから、すべてのサンプルが不純物フリーであり、ダウンストリーム処理に適していることが示されました。

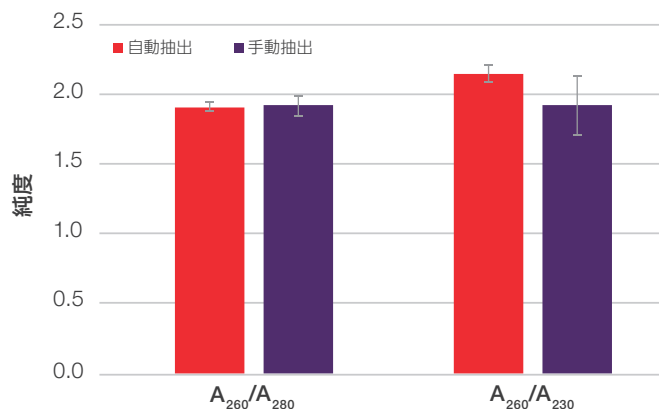


図 6. ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kit による自動抽出および手動抽出サンプルにおける平均純度

DNA アイソフォーム—自動抽出と手動抽出の比較

ChargeSwitch NoSpin キットによる自動抽出法と手動抽出法で精製した pDNA のインテグリティを評価するために、サンプルを 1% アガロースゲルで分離させました。手動抽出サンプルをレーン 1~3 に、KingFisher Flex システムを用いた自動抽出サンプルをレーン 4~7 に注入した結果 (図 7)、いずれの抽出サンプルもスーパーコイル状 pDNA が主要アイソフォームで、次にニック入り pDNA が続きました。

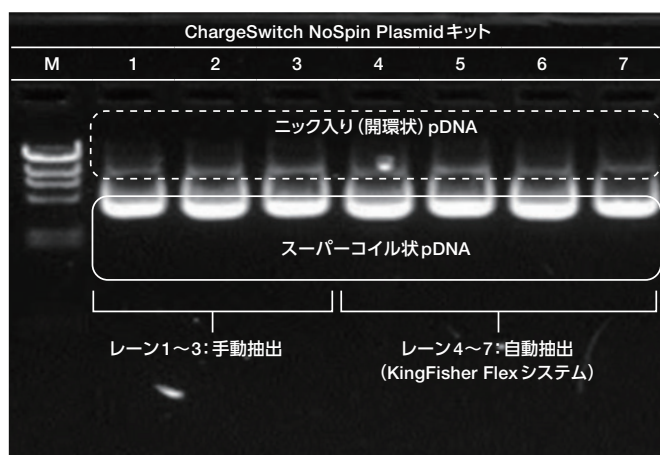


図 7. ChargeSwitch NoSpin Plasmid Micro Kit による自動抽出及び手動抽出サンプルにおける DNA アイソフォームの比較

考察

ChargeSwitch NoSpinキットも他社の磁気ビーズキットも、ハイスループットのワークフローに適したペレットフリー抽出法を可能にします。時間のかかる遠心分離操作を抽出プロセスから省略することは、ワークフロー効率を上げるための1つの手段といえます。もちろん、プロセス全体にかかる負担や制約も排除できなければ、遠心操作の省略に伴う価値を真に実感することはできません。今回評価したChargeSwitch NoSpinキットとKingFisher Flexシステムの併用は、自動化システムで抽出処理を実行するので、他のワークフロー操作（プレート調製など）に必要な自動液体処理システムや物理的リソースから解放された最適なソリューションを提供できます。また、KingFisher Flexシステムを用いた自動化では、抽出と同時にプレート調製を行うことができるため、スループットの向上が可能となります。主な制約要因といえば、効率性を最大化させるために何台のKingFisherシステムを統合できるかという点くらいでしょう。

他社の磁気ビーズキットは「最速の」ペレットフリーキットをうたっていますが、我々の評価からはこの宣伝文句が正しくないことが判明しています。手動抽出に関しては、他社の磁気ビーズキットもChargeSwitch NoSpinキットも処理時間は約90分と遜色ありませんでしたが、自動抽出における総合的なスピードではChargeSwitch NoSpinキットの方が迅速に処理できました。他社の磁気ビーズキットのユーザーマニュアルに示されている時間計算によると、他社の磁気ビーズキットによる96サンプルの自動抽出には、バッファの調製やピペット操作を含めて約2時間かかると記されています。これに対してChargeSwitch NoSpinキットを用いたワークフローは、KingFisherの自動化システムを併用することで1時間もかからずに処理を完了できます（KingFisher Flexシステムのプロトコルに44分、手動ピペット操作に10分）。

pDNA収量はプラスミドのコピー数や、培養条件、および細菌株の違いに左右されるものの、ChargeSwitch NoSpinキットやChargeSwitch Plasmid ERキットによる平均収量は他社の磁気ビーズキットよりも高いことが確認できました。また、KingFisher Flexシステム上でChargeSwitch NoSpinキット用の自動化プロトコルを実行することで、平均収量は手動処理のほぼ3倍になりました。

従来型の手動もしくは液体処理ロボットを用いた磁気ビーズ抽出法は、磁気的に結合したpDNAを液体移動によって分離します。対して、KingFisherシステムを用いた抽出法では、液体ではなく磁気的に結合したビーズを移動させて抽出するため、従来型にみられたビーズロスや削減し、ひいては全体としてのpDNA収量の増大が期待できます。キット効率を下げる要因に

は、このような抽出技術の他に、細菌の培養条件やバッファの調製時間が挙げられます。取扱説明書によると、他社の磁気ビーズキットは96ウェルブロックで細菌を培養するよう指示されています。細菌へのエアレーションは容器の容量やサイズによって制限されることから、この操作指示は収量に負の影響を及ぼすおそれがあります。ChargeSwitch NoSpinキットは培養容器のサイズに制限を課しておらず、かつ細菌培養に必要な総時間も短く設定されています。他社の磁気ビーズキットと異なり、ChargeSwitch NoSpinキットには抽出に必要なすべてのバッファが含まれており、必要な調製操作といえば、事前に分取したRNase AをInvitrogen™ ChargeSwitch™再懸濁バッファに添加する操作のみです。他社の磁気ビーズキットとは違い、ChargeSwitch NoSpinキットは溶解バッファの加熱が必要なく、細菌細胞の溶解に必要な総時間を短縮して抽出プロセスを簡略化できます。

ChargeSwitch NoSpinキットも他社の磁気ビーズキットも、 A_{260}/A_{280} 比の評価によって理想的なレベルの「純粋な」DNAを精製できることが確認できましたが、 A_{260}/A_{230} 比の評価ではChargeSwitch NoSpinキットの方が他社の磁気ビーズキットよりも優れた結果が得られました。 A_{260}/A_{230} は230 nmに吸光ピークをもつ不純物質によるコンタミネーションを示す高感度の指標で、この波長の光を吸収する一般的な不純物にカオトロピック塩、非イオン性界面活性剤、フェノール化合物があります。ChargeSwitchバッファの化学組成から予想されたとおり、ChargeSwitch NoSpinキットは A_{260}/A_{230} 上でも理想的な純度が得られました。

エンドトキシン濃度については、他社の磁気ビーズキットはエンドトキシンフリーもしくは低エンドトキシンの抽出法と呼べる基準を満たしていませんでした。エンドトキシンは、細胞内免疫反応の非特異的な活性化を促すことにより、(1) さまざまな細胞株における最適とはいえない核酸導入や毒性、(2) 感受性細胞におけるタンパク発現の低下、(3) 健康への悪影響をもたらし得ることから問題の種となっています。他社の磁気ビーズキット抽出サンプルの平均エンドトキシン濃度は114.5 EU/ μ g pDNAと、モレキュラーグレードのプラスミド精製キットと同程度でした。モレキュラーグレードのキットでありエンドトキシン低減化をうたっていないChargeSwitch Plasmid NoSpin Micro Kitについては、エンドトキシン濃度が1.0 EU/ μ g pDNAを上回るものと考えて評価しませんでした。ChargeSwitchビーズの混合段階で、ライセート上清にエンドトキシン除去剤を添加して低エンドトキシンまたはエンドトキシンフリーの抽出を達成することが可能です。

まとめ

当社が提供する磁気ビーズの ChargeSwitch Plasmid キットはいずれも、他社の磁気ビーズキットより優れたパフォーマンスを示しました。KingFisher システムと自動液体処理システムの併用が最も円滑な抽出シナリオですが、KingFisher システム単独でも、2 回の手動添加操作が必要となるだけで十分に効率的かつ簡便なプラスミド抽出が可能となります。プラスミド・ミニプレップ法を最大限自動化したいユーザーは、ChargeSwitch Plasmid NoSpin Micro Kit と Thermo Scientific™ KingFisher™ システムの併用によって、事前の手動操作や遠心分離が必要な磁気ビーズキットとほぼ同量のプラスミド DNA を精製していただけます。

研究用にのみ使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2023 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。thermofisher.com/jp-tc **IVN139-A23110B**

サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@thermofisher.com

オーダーサポート TEL : 03-6832-6980 FAX : 03-6832-9584

営業部 TEL : 03-6832-9300 FAX : 03-6832-9580

 facebook.com/ThermoFisherJapan

 [@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

thermofisher.com

invitrogen