

Residual DNA quantitation

核酸抽出効率の比較

KingFisher Duo Primeシステムを用いた磁気ビーズ抽出法と
スピンカラム抽出法の比較

概要

- Thermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime 核酸・タンパク質・細胞自動抽出・精製装置を用いた磁気ビーズ抽出法は、スピンカラム法よりもマニュアルによる作業時間が短縮されます。
- KingFisher Duo Primeシステムを用いると、サンプル量が少なくても優れた核酸抽出（同様のDNA収量、より高品質のRNA）を実現します。
- Applied Biosystems™ MagMAX™ 核酸抽出キットは、多種多様なサンプルに対応したハイスループット処理が可能です。

はじめに

生体試料の分子生物学的解析では核酸抽出が日常的に行われますが、核酸の正確な定量には精製手法が大きく左右します。核酸の抽出には、スピンカラムを用いた固相抽出法や磁気ビーズ抽出法がよく使われます。Thermo Scientific™ KingFisher™ システムを用いた磁気ビーズ抽出法は、多種多様なサンプルタイプからのDNAやRNAの分離に、ハイスループットの半自動化ソリューションをもたらします。磁気ビーズ抽出キットとKingFisher Duo Primeシステムを併用すると、さまざまなサンプルタイプに対する小スケールの半自動化ワークフローが実現するのみならず、マニュアルによる作業時間も最小限で済みます。本資料では、KingFisher Duo Primeシステムが安定した収量と品質の得られる核酸抽出法であることを、スピンカラム抽出法と比較しながら紹介していきたいと思います。

材料・方法

サンプル調製と核酸の品質

2名のドナーから全血検体を採取し、凍結血液からDNAを、新鮮な全血サンプルからRNAを抽出しました。また、接着性の肺がん細胞株3種をATCC から購入し、NCI-H1650 (ATCC、製品番号:CRL-5883) と NCI-H1781 (ATCC、製品番号:CRL-5894) をDNA抽出に、NCI-H23 (ATCC、製品番号:CRL-5800) と NCI-H1781 をRNA抽出に使用しました。組織サンプルからの核酸抽出にはウサギの肝臓と心臓を使用しました。磁気ビーズを用いたDNA抽出にはApplied Biosystems™ MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra 2.0 KitとKingFisher Duo Primeシステム（各サンプルタイプに応じたDNA抽出プロトコル）を用い、磁気ビーズを用いたトータルRNA（スモールRNAを含める）の抽出には、Applied Biosystems™ MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation Kitを用いました。スピンカラムによるRNAとDNAの抽出には、サンプルタイプに適したキット（A社キット、B社キット）を提供される取扱説明書どおりに使用しました。

インプットしたサンプル量は、全血からのDNAおよびRNA抽出には50 µLおよび100 µL、細胞からのDNAおよびRNA抽出には10,000および100,000細胞、ウサギの肝臓および心臓組織からのDNAおよびRNA抽出には2.5 mgおよび10 mgとしました。抽出したDNAの収量、品質、純度（A260/A280およびA260/A230）を、Thermo Scientific™ NanoDrop™ 8000 マルチチャンネル超微量紫外可視分光光度計で分析しました。また、RNAの収量をNanoDrop 8000 マルチチャンネル超微量紫外可視分光光度計で、品質をAgilent™ 2100 バイオアナライザで分析しました。また、RT-qPCR アッセイによるダウンストリームの遺伝子発現解析ならびにgDNA コンタミネーションレベルの検出からも、RNAの品質を確認しました。

RT-qPCRを用いた遺伝子発現解析

遺伝子発現レベルを、Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 リアルタイムPCRシステム (384 ウェルブロック、高速サイクル条件) を用いた 1 ステップ RT-qPCR で評価しました。具体的には、20 μ L の PCR 反応あたり、細胞または血液サンプルから精製した核酸 2 μ L、心臓組織 (10 倍希釈) から精製した核酸 2 μ L もしくは肝臓組織 (100 倍希釈) から精製した核酸 2 μ L を、5 μ L の Applied Biosystems™ TaqMan™ Fast Virus 1-Step Master Mix と 1 μ L の Applied Biosystems™ TaqMan™ Gene Expression Assay プライマー & プロブセット (20X) を含有する反応ミックスに添加して反応液を調製しました。反応条件の設定は、50 °C、5 分間の逆転写 (RT) 反応を 1 サイクル、95 °C、20 秒間の逆転写酵素不活化と初回熱変性を 1 サイクル、95 °C で 3 秒間の反応活性化と 60 °C で 30 秒間の増幅を 40 サイクルとしました。qPCR 反応は 2 回ずつ行い、自動設定で決定した閾値とベースラインを用いてデータ解析を行いました。

RNA サンプル中のゲノム DNA 評価

RNA サンプル中のゲノム DNA (gDNA) コンタミネーションを、Invitrogen™ SuperScript™ IV VILO™ Master Mix を用いて評価しました。SuperScript IV VILO キットには逆転写酵素を含有する +RT マスターミックスと逆転写酵素を含有しない -RT マスターミックスが含まれており、RNA サンプル中の gDNA を検出できます。おのおのの RNA サンプルに対して +RT マスターミックスを加えた逆転写反応と -RT マスターミックスを加えた逆転写反応 (ネガティブコントロール) を行った後、これらをさらにエクソンをターゲットとする qPCR アッセイにかけて RNA と gDNA を検出しました。具体的には、逆転写反応を済ませた +RT 反応液および -RT 反応液 2 μ L を、5 μ L の Applied Biosystems™ TaqMan™ Fast Advanced Master Mix for qPCR と 1 μ L の TaqMan Gene Expression Assay プライマー & プロブセット (20X) を含有する反応ミックスに添加して反応液 20 μ L を調製しました。反応条件の設定は、50 °C、2 分間を 1 サイクル、95 °C、20 秒間を 1 サイクル、95 °C で 1 秒間の反応活性化と 60 °C で 20 秒間の増幅を 40 サイクルとしました。

結果

MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit と KingFisher Duo Prime システムを用いた DNA の抽出

3 種の異なるサンプルタイプ全てを総合的に判断すると、磁気ビーズ抽出法は、スピнкаラム法に代わる効率的かつ自動化の容易な DNA 抽出法であるといえます (図 1)。ただし、サンプルタイプによって違いが認められ、例えば、細胞からの DNA 収量は、磁気ビーズ法と A 社のスピнкаラム抽出キットでは同程度でしたが、B 社キットはどの細胞インプット数に対しても高い収量が得られました。また、ウサギの心臓および肝臓組織からの抽出では、磁気ビーズ法の方が両社のスピнкаラム抽出キットよりも高い収量が得られ、全血サンプルからの DNA 分離では、いずれのキットも同様の抽出能を示しました。抽出 DNA の純度 (A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230}) は、抽出法やサンプルタイプにかかわらずおおむね同程度でした。

MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kit と KingFisher Duo Prime システムを用いた RNA の抽出

MagMAX mirVana キットを用いた磁気ビーズ法で抽出できた RNA 収量は、組織および全血サンプルではスピнкаラム法よりも高く、細胞サンプルでは同程度でした (図 3)。抽出 RNA の純度を Agilent 2100 バイオアナライザによる電気泳動で評価したところ、抽出手法によって RNA の品質に大きな差が認められました。まず、MagMAX mirVana キットは、スピнкаラム法よりも高品質の RNA およびスモール RNA を分離できました (図 4)。いずれの手法も質の高い RNA を抽出できましたが、スピнкаラム法 (特に B 社のスピнкаラムキット) では細胞および全血サンプルの電気泳動図に複数の追加ピークが出現しており、gDNA コンタミネーションが示唆されました (図 4)。

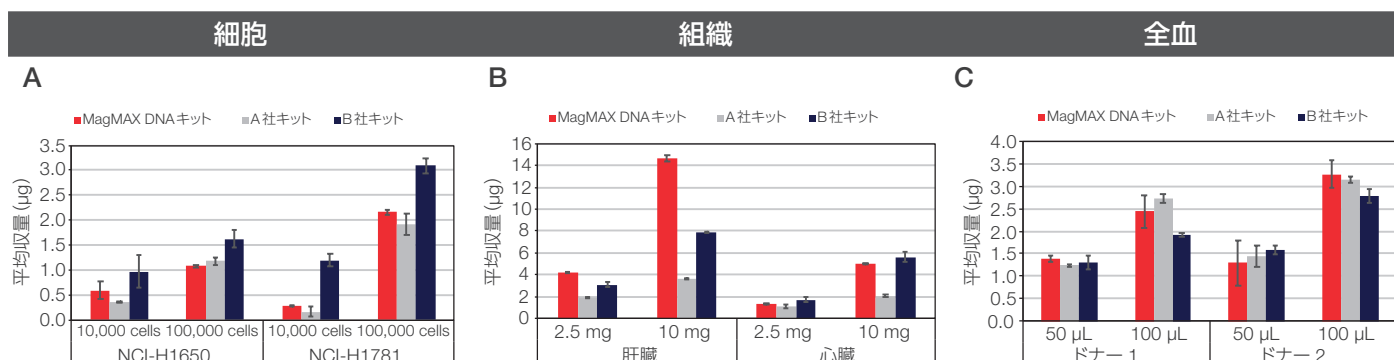


図 1. MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit と KingFisher Duo Prime システムを用いた抽出法による (A) 細胞、(B) 組織、(C) 全血からの DNA 収量

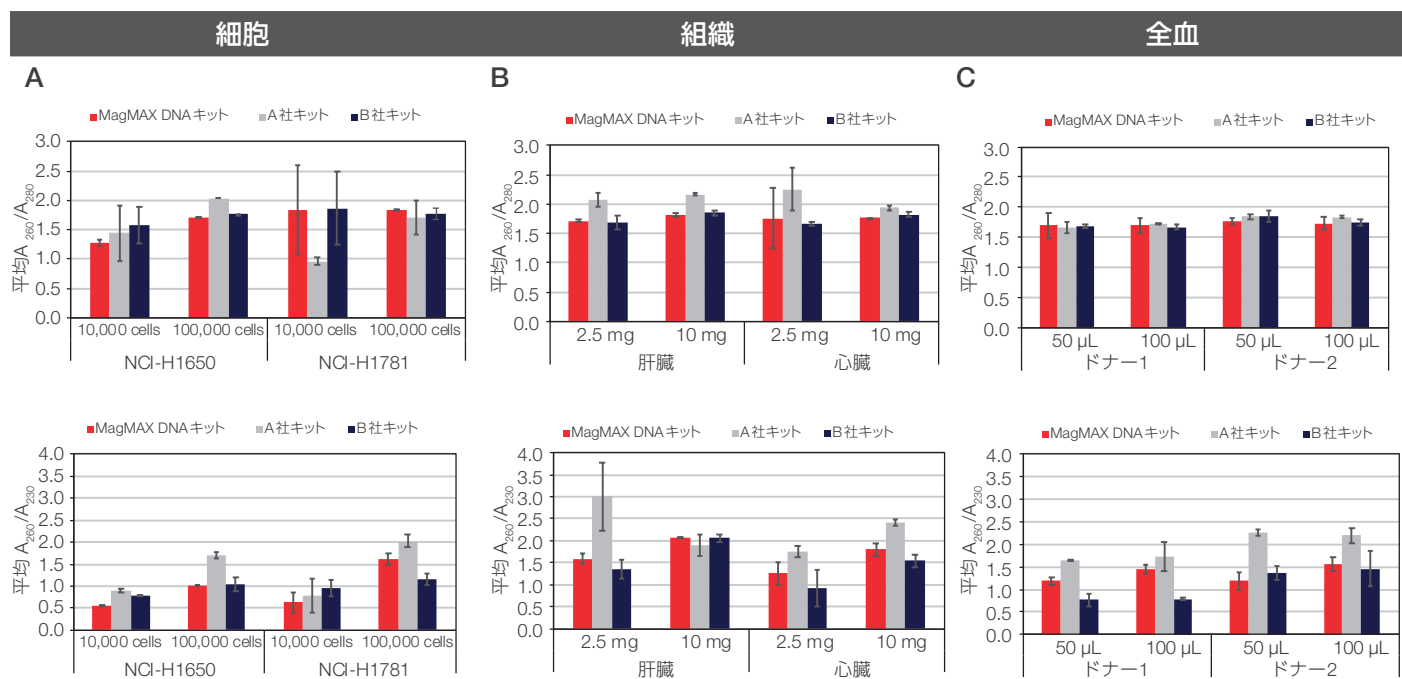


図2. 細胞、組織、全血からの抽出DNAの純度 MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 KitとKingFisher Duo Primeシステムを用いて、(A) 細胞、(B) 組織、(C) 全血から精製したDNAの A_{260}/A_{280} 値と A_{260}/A_{230} 値を算出しました。

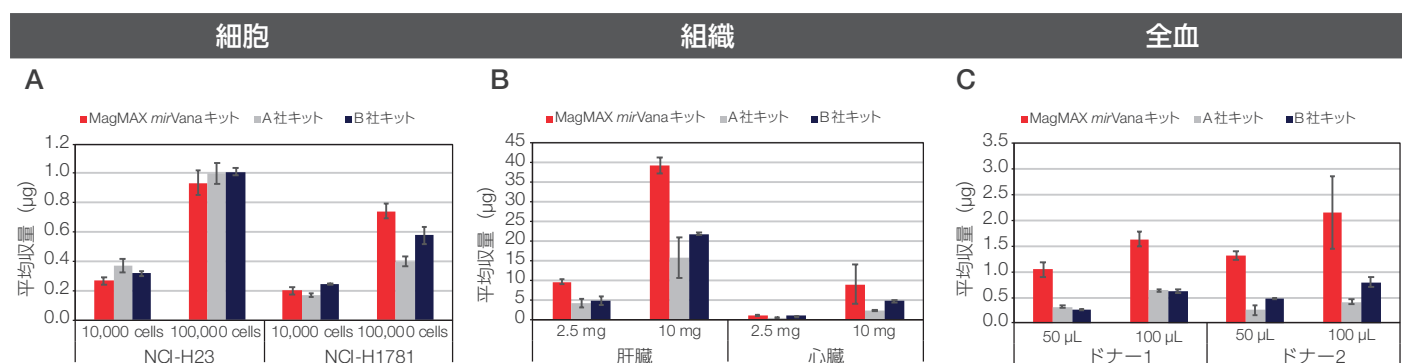


図3. MagMAX mirVana Total RNA Isolation KitとKingFisher Duo Primeシステムを用いた抽出法によるRNA収量 (A) 細胞からのRNA収量はどれも同程度でしたが、(B) 組織や (C) 全血からは磁気ビーズ法の方がスピニング法より高い収量が得られました。

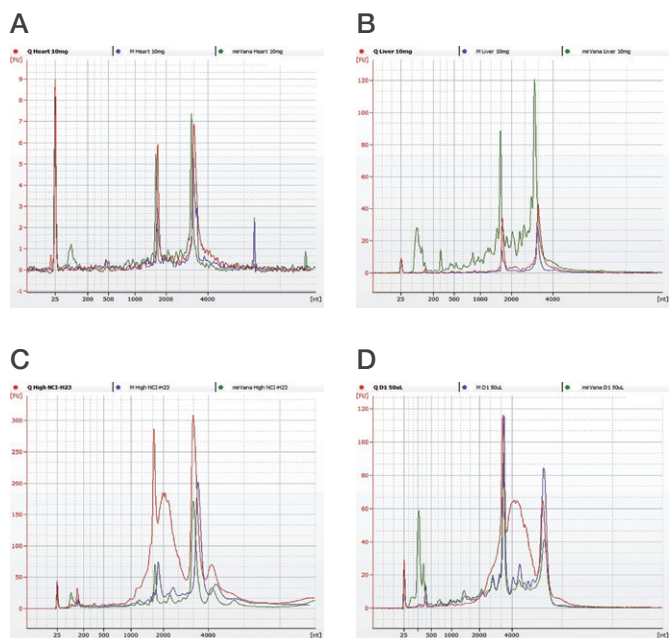


図4. Agilent 2100 バイオアナライザを用いて解析した細胞、組織、全血からのRNAの品質 (A) 心臓組織と (B) 肝臓組織から抽出したトータルRNA (スモールRNAを含める) の品質は、MagMAX mirVana Total RNA Isolation Kitを用いた方がスピカラムよりも高品質でした。また、MagMAX mirVana キットは、(C) gDNA コンタミネーションのない細胞内RNA、および (D) 少量の全血サンプルからのRNAを抽出できました。

全血サンプルからの抽出RNAを用いてダウンストリームの遺伝子発現解析を行い、ハウスキーピング遺伝子である *ACTB* と *ADH5* の増幅サイクル数 (C_t) を調べたところ、 C_t 値に有意な差は認められませんでした (図5A)。一方、gDNA コンタミネーションの解析では、B社のスピカラムを用いて抽出したRNAにはgDNA コンタミネーションがみられ、低い C_t 値を示しました。MagMAX mirVana キットやA社のスピカラムによる抽出RNAにgDNA コンタミネーションは認められませんでした (図5B)。この結果を裏付けるように、Agilent 2100 バイオアナライザによる電気泳動図にもgDNAの混在を示す追加波形が出現していました。

細胞サンプルからの抽出RNAの *ACTB* および *ADH5* 遺伝子発現レベルはいずれの手法も類似しており、同様の C_t 値でした (図6A)。ただし、MagMAX mirVana キットによる抽出RNAは、 C_t 値が最も高かったことからみてとれるように、gDNA コンタミネーションが最小でした (図6B)。組織サンプルについては、*ACTB* および *ADH5* に対する C_t 値はMagMAX mirVana キット抽出RNAの方が低く、高収量が示唆されました (図7)。

スピカラム法と磁気ビーズ法はダウンストリームの遺伝子発現解析での使用に必要なRNAを効率的に抽出しており、評価した各種キットにとってRNA収量は制約要因とはならないことが示唆されました。一方で、品質に関しては各キットによる抽出RNA間でばらつきがあり、ダウンストリームアプリケーションに影響する可能性を完全には否定できません。

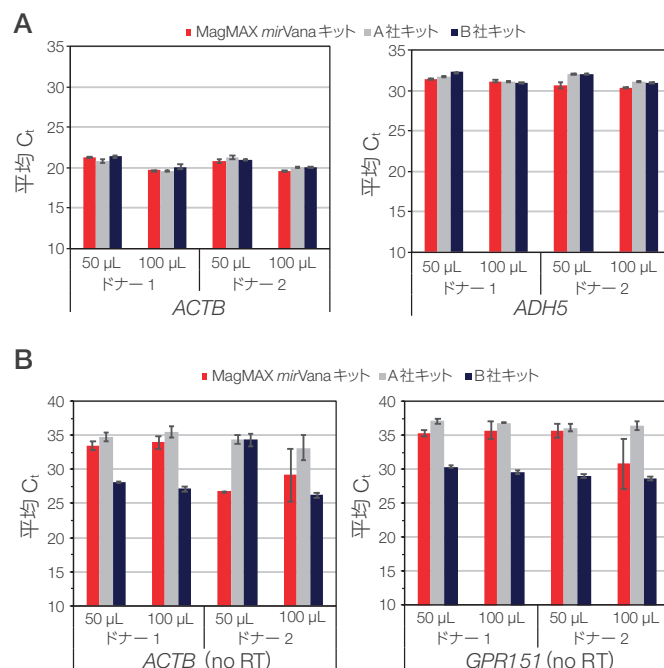


図5. 血液サンプルから精製したRNAの遺伝子発現とgDNA コンタミネーションの解析 (A) 血液検体から分離したRNAの遺伝子発現レベルは、3種いずれのキットも同様の結果が得られました。(B) gDNA コンタミネーション解析によると、B社のスピカラムで分離したRNAの C_t 値が最も低く、gDNA コンタミネーションが多いことが示唆されました。

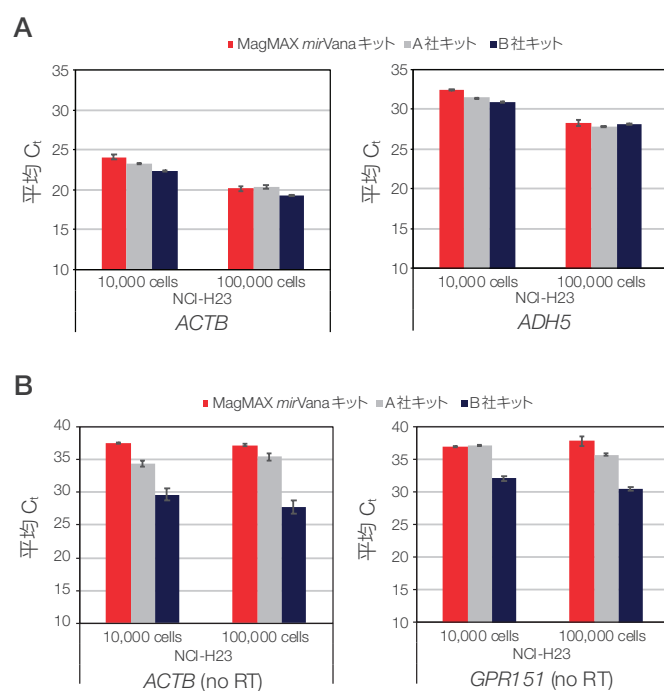


図6. 細胞サンプルから精製したRNAの遺伝子発現とgDNA コンタミネーションの解析 (A) 細胞から分離したRNAの遺伝子発現レベルは、3種いずれのキットも同様の結果が得られました。(B) gDNA コンタミネーション解析によると、B社のスピカラムを用いて分離したRNAの C_t 値が最も低く、gDNA コンタミネーションが多いことが示唆されました。

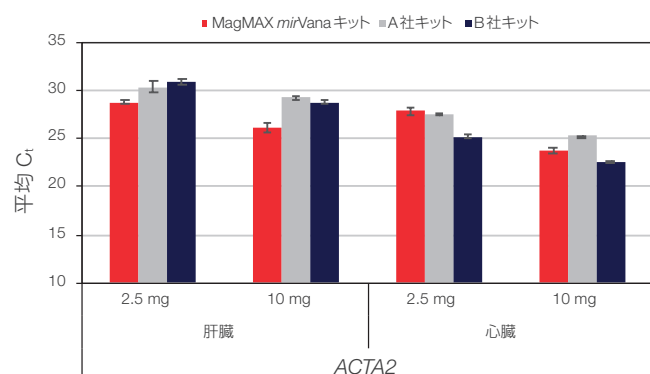
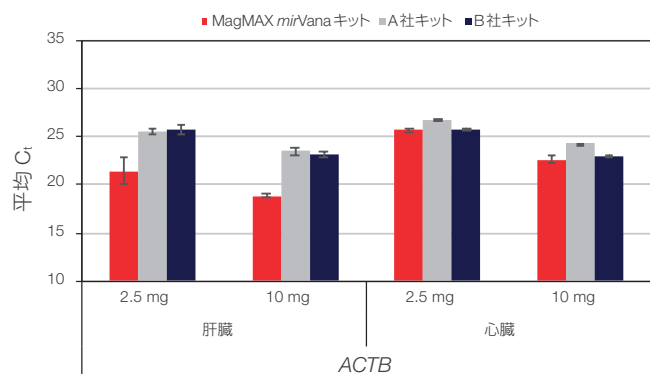


図7. 肝臓および心臓組織サンプルから精製したRNAの遺伝子発現解析 MagMAX mirVanaキットで分離したRNAの C_t 値は低く、スピнкаラムより収量が高いことが示唆されました。

結論

現在市販されているDNAおよびRNAのスピнкаラム抽出法と磁気ビーズ抽出法のワークフローやマニュアルによる作業時間には、実用に影響し得る差が存在します。MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kitを用いたDNA抽出法をスピнкаラム法と比較評価したところ、前者の磁気ビーズ法は収量および品質ともにダウンストリームアプリケーションに適した優れたDNAを精製できました。またRNAの抽出については、磁気ビーズ法もスピнкаラム法も増幅可能なRNA収量が得られましたが、MagMAX mirVana Total RNA Isolation KitはさらにgDNAコンタミネーションのない高品質のRNAを精製できました。今回の比較評価で示されたように、スケーラブルかつ自動化可能なKingFisher Duo Primeシステムを用いた磁気ビーズワークフローは、多種多様なサンプルタイプに対応でき、柔軟性があり、かつ時間の節約も可能な核酸抽出法を実現します。

Ordering information

製品名	容量	製品番号
MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit	1 kit	A36570
MagMAX DNA Ultra 2.0 with Cell and Tissue Extraction Buffer	1 kit	A45721
MagMAX <i>mirVana</i> Total RNA Isolation Kit	96 reactions	A27828
KingFisher Duo Prime 核酸・タンパク質・細胞自動精製装置	1 instrument	5400110
NanoDrop 8000 マルチチャンネル超微量紫外可視分光光度計	1 instrument	ND-8000-GL (販売終了)
NanoDrop Eight 微量分光光度計	1 instrument	NDE-GL
TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix	1 x 1 mL	4444432
	5 x 1 mL	4444434
	1 x 10 mL	4444436
TaqMan Gene Expression Assay	Variable	4331182
SuperScript IV VILO Master Mix	50 reactions	11756050
TaqMan Fast Advanced Master Mix for qPCR	1 x 5 mL	4444557
QuantStudio 5 リアルタイムPCR システム	1 instrument	thermofisher.com/quantstudio を ご参照ください

 詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/kingfisherduo

研究用에만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.

TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license.

Agilent and Bioanalyzer are trademarks of Agilent Technologies.

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 **SPA049-A23120B**

販売店

**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

thermofisher.com