

Sample prep

骨髄穿刺および末梢血単核細胞からのゲノム DNA 抽出

背景と概要

骨髄穿刺 (BMA) サンプルと末梢血単核細胞 (PBMC) サンプルは、さまざまな疾患研究に多用されると同時に確かなサンプル調製技術が要求されます。BMAやPBMCから抽出した核酸は、Ion Torrent™ Oncomine™ Myeloid Research Assayを用いた次世代シーケンシング (NGS) や、Applied Biosystems™ CytoScan™ アレイやApplied Biosystems™ CytoScan™ HDアレイを用いたマイクロアレイ解析、SNP ジェノタイピングアッセイを用いたリアルタイムPCRなど、さまざまなアプリケーションに利用できます。

Applied Biosystems™ MagMAX™ DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kitは磁気ビーズを用いた抽出キットで全血、唾液、パフィーコート、口腔スワブからのゲノムDNA (gDNA) 抽出の半自動化や自動化に対応しています。本資料ではThermo Scientific™ KingFisher™ Duo Prime核酸・タンパク質・細胞自動抽出・精製装置とMagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kitを用いたBMAおよびPBMCからのgDNA抽出ワークフローを評価していきたいと思います。Applied Biosystems™ MagMAX™ Cell and Tissue DNA Extraction Bufferで調製したサンプルを抽出処理にかけた後、DNAインテグリティ解析とリアルタイムPCRを通して、高品質のgDNAを本ワークフローで精製できることを確認します。



実験手順

MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kitを用いてBMAおよびPBMCからgDNAを抽出する2通りの実験を実施しました。

1つめの実験では、異なるドナーから採取したBMA検体3サンプルを、図1のサンプル調製ワークフローに従って2回ずつ抽出処理しました。200 µLのBMAサンプルを1.5 mLのEppendorf™チューブに移し、0.2 xgで10分間遠心分離にかけて細胞をペレット化しました。チューブ底部のペレットに触れないよう注意深く上清を取り除き、残ったペレットをMagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kitに含まれているMagMAX Cell and Tissue DNA Extraction Buffer (製品番号:A45721) 400 µLで再懸濁しました。処理サンプルは全血ではなく再懸濁した細胞ペレットですが、これ以降の操作は、KingFisher Duo Primeシステムでの全血 (200～400 µL) DNA抽出プロトコル (文書番号:MAN0017325) に従って行いました。

2つめの実験では、異なるドナーから採取したPBMC検体3サンプルを、図1のワークフローに従って2回抽出処理しました。1～2 × 10⁶細胞のサンプルインプットを1.5 mL

Eppendorfチューブに移し、500～800 xgで10分間遠心分離にかけて細胞をペレット化しました。チューブ底部のペレットに触れないよう注意深く上清を取り除き、残ったペレットを400 µLのMagMAX Cell and Tissue DNA Extraction Bufferで再懸濁しました。これ以降の操作は、KingFisher Duo Primeシステムでの培養細胞DNA抽出プロトコル (文書番号:MAN0018808) に従いました。

上記の処理で抽出した二本鎖DNA (dsDNA) を、Invitrogen™ Qubit™ 1X dsDNA Broad Range (BR) Assay Kitで定量しました。また、DNAのインテグリティと塩基対 (bp) サイズを、Agilent™ 4200 TapeStation™システムとAgilent™ Genomic DNA ScreenTape™システムで解析しました。qPCRによるDNAの品質解析では、Applied Biosystems™ TaqMan™ Assay (アッセイID:Hs02758991 および Hs03023880) とApplied Biosystems™ TaqMan™ Universal Master Mix II (no UNG) を用いて反応液を調製し、Applied Biosystems™ ViiA™ 7リアルタイムPCRシステム (384ウェルフォーマット) でgDNAのターゲット領域GAPDHとACTBを検出しました。

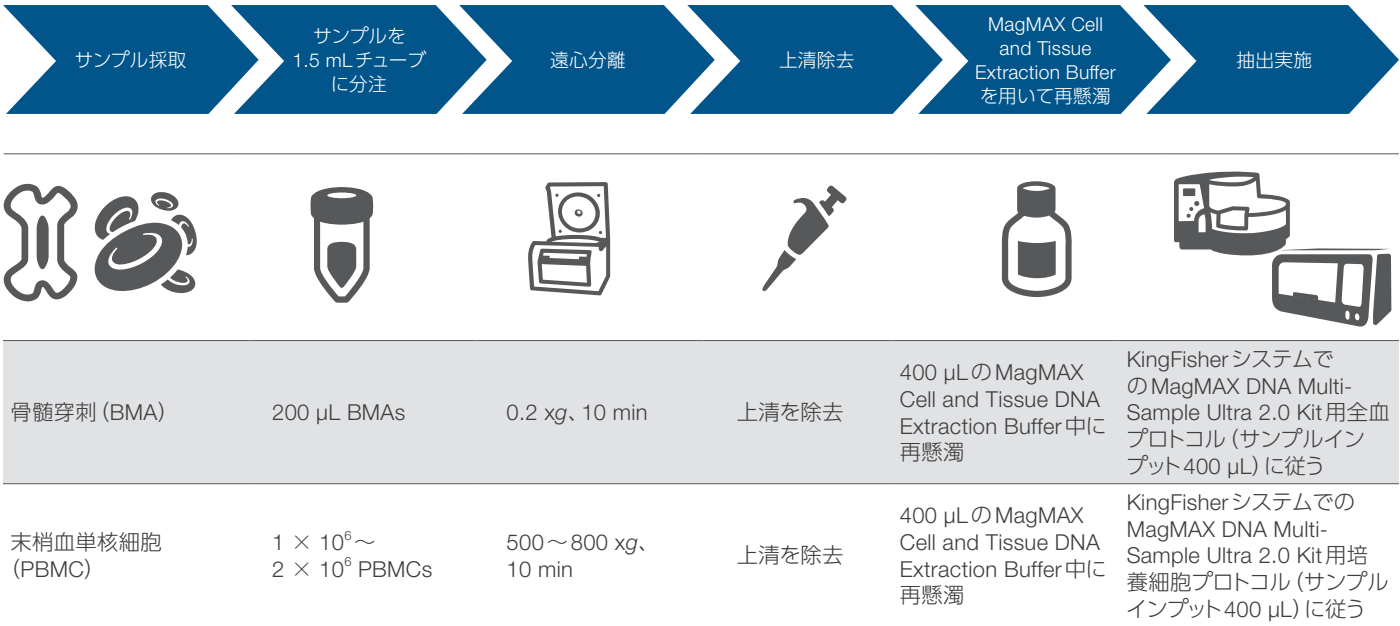


図1. MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 KitとKingFisherシステムを用いたBMAおよびPBMCからのgDNA抽出ワークフロー

結果と考察

Qubit 1X dsDNA BR Assay Kit で定量した dsDNA 収量によると、BMA や PBMC から回収した DNA にはいずれも各サンプル間でばらつきがみられました (図 2A、2B)。BMA からの抽出量は、4.54 ng/μL (サンプル 2) ~ 52.40 ng/μL (サンプル 3) の範囲でした。PBMC からは一様に 80 ng/μL を上回る高い収量が得られました。

BMA サンプルの DNA インテグリティ指数 (DIN) は 3 サンプルともに 7.0 を上回っており、電気泳動図にも強い gDNA ピークが出現していました (図 3)。PBMC サンプルも 3 サンプルとも

に 9.0 を上回る DIN と強い gDNA ピークが認められました。ViiA 7 リアルタイム PCR ソフトウェアを用いた qPCR 解析によると、BMA も PBMC もすべてのサンプルで gDNA ターゲット遺伝子の *ACTB* と *GAPDH* が大量に増幅されました (図 4)。

注: サンプルプレートの調製中、MagMAX Cell and Tissue DNA Extraction Buffer で再懸濁したサンプルを 96 ディープウェルプレート内のエンハンサー液に添加する際に白色沈殿物が生じました。この沈殿物は、プロテイナーゼ K による高温分解処理中に溶解し、DNA 回収に影響を及ぼしませんでした。

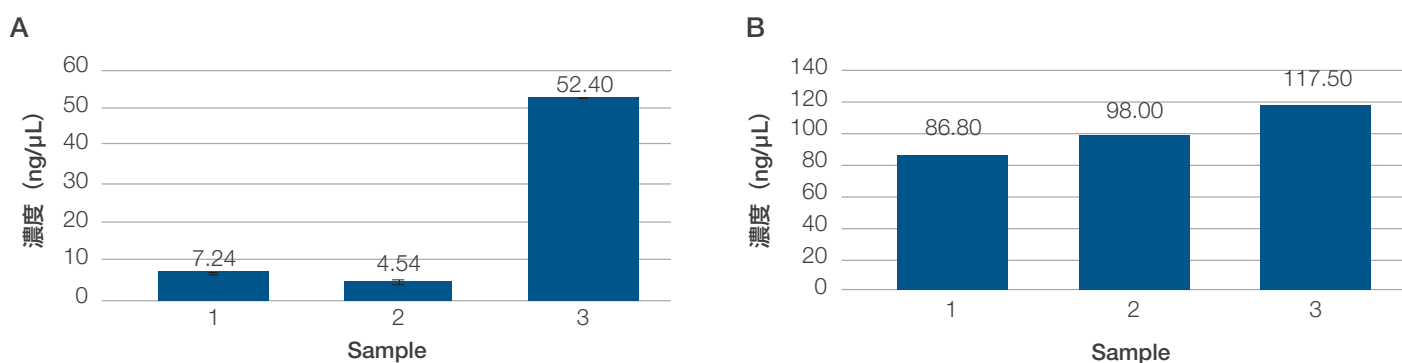


図 2. 3 サンプルからの gDNA 収量 MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit と KingFisher Duo Prime システムを用いて (A) BMA サンプルと (B) PBMC サンプルから gDNA を抽出し (サンプル調製には MagMAX Cell and Tissue DNA Extraction Buffer を使用)、おのこの dsDNA 濃度を Qubit 1X dsDNA BR Assay Kit で定量して各サンプルの抽出法を評価しました。

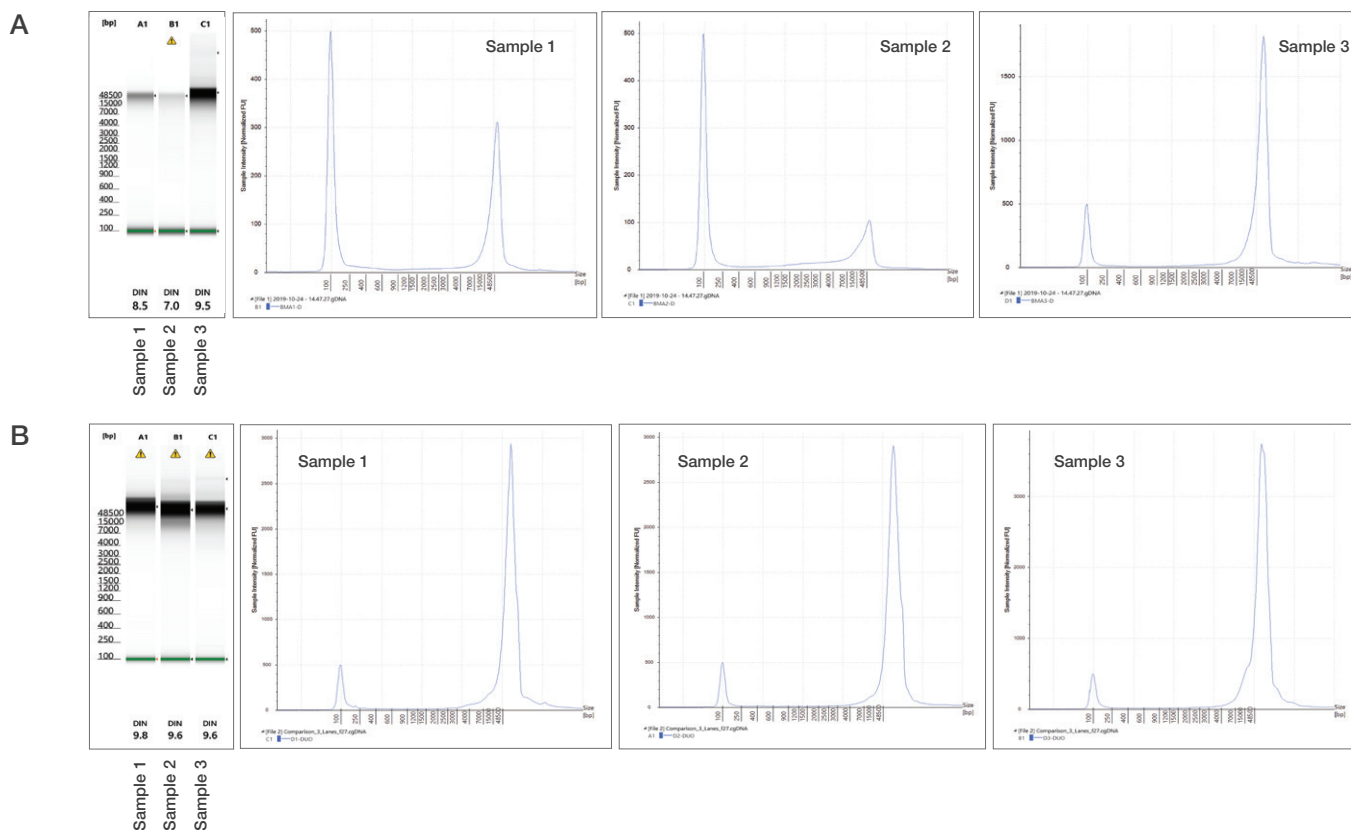


図 3. DNA のインテグリティとサイズ MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit と KingFisher Duo Prime システムを用いて (A) BMA サンプルと (B) PBMC サンプルから gDNA を抽出しました。Agilent 4200 TapeStation システムから出力したゲル分離パターン (左) には DIN 値が記されています。電気泳動図 (右) からは回収した DNA のインテグリティと bp サイズが読み取れます。

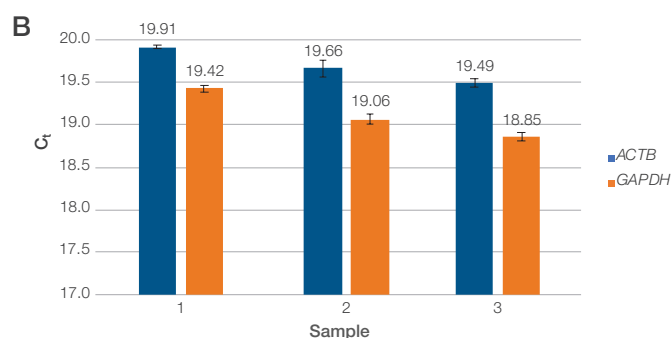
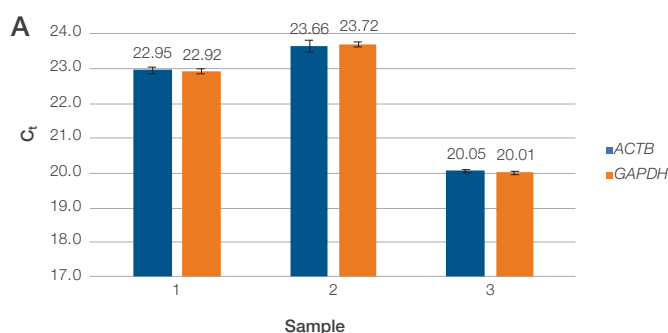


図4. 処理サンプルのqPCRデータ MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 KitとKingFisher Duo Primeシステムを用いて (A) BMAサンプルと (B) PBMCサンプルからgDNAを抽出し、ViiA 7 リアルタイムPCRシステムとTaqMan AssayでACTBとGAPDHを増幅させました (ViiA 7 リアルタイムPCRソフトウェアによる解析データ)。

結論

MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 KitとKingFisherシステムの併用は、BMAやPBMCサンプルからの円滑なgDNA精製アプローチを実現します。このアプローチによって、MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 KitとKingFisherプラットフォームで処理できるサンプルの種類が広がります。BMAやPBMCサンプルから抽出されたgDNAの収量および品質が示すように、本資料で紹介したgDNA抽出法は、多様なリサーチアプリケーションに使用できる高品質なgDNAの収集に適した精製ワークフローです。

著者

Michelle Leija, Lillie Manley, Thilanka Jayaweera, Anthony Pedroza (サーモフィッシャーサイエンティフィック所属)

Ordering information

製品名	製品番号
MagMAX DNA Multi-Sample Ultra 2.0 Kit	A36570
MagMAX DNA Ultra 2.0 with Cell and Tissue Extraction Buffer	A45721
KingFisher Duo Prime	5400110
ViiA 7 リアルタイムPCRシステム 384 ウェルブロック	4453536
Qubit 1X dsDNA Broad Range (BR) Assay Kits	Q33265

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

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.

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

Eppendorf is trademarks of Eppendorf SE. Agilent, TapeStation, and ScreenTape are trademarks of Agilent Technologies, Inc.

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

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 SPA050-A23120B

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

applied biosystems