

PCRキャリーオーバーの排除

Liquid Handling Consumables, Thermo Fisher Scientific

要約

Thermo Scientific™ ART™セルフシーリングバリアチップのキャリーオーバーコンタミネーション防止効果を確認するために、フィルターなしのピペットチップとの比較テストを行いました。HIV-1 DNAおよび放射性同位体を使用する実験を組み立て、ARTバリアチップがエアロゾルおよび液体の通過を遮断し、その後のサンプルのコンタミネーションを防止する能力についてテストを行いました。

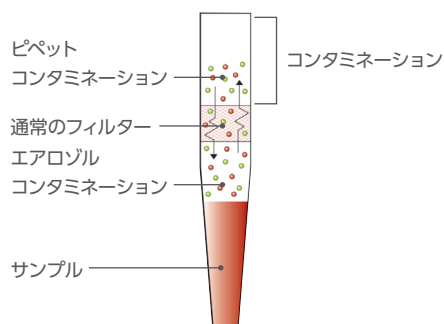
はじめに

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を成功させるためには、注意深いサンプルおよび試薬の取り扱いにより、反応の品質を維持することが極めて重要です。あらゆるクロスコンタミネーションが、誤ったシグナルまたは外来性DNA増幅の原因となる可能性があります。

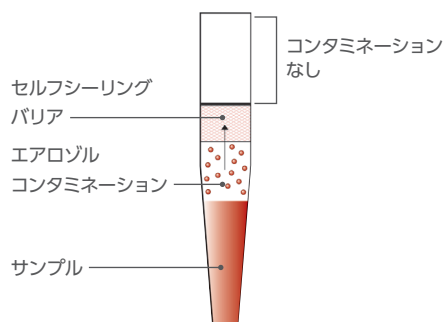
誤ったシグナルの最も一般的な原因は、一つのチューブから別のチューブへの以前に増幅されたDNAのキャリーオーバーまたはその他の形態のサンプル間コンタミネーションです。ピペット操作により生成するエアロゾルは、ピペットに吸引され、ピペットの空気置換によりその後のサンプルに移行する可能性があります。

このようなキャリーオーバーコンタミネーションを防止するために、サーモフィッシャーでは、液体やエアロゾルの通過を遮断するようにデザインされたバリアを組み込んだARTセルフシーリングバリアチップを開発しました。これにより、過剰吸引またはエアロゾル形成によるピペットのコンタミネーションの可能性が排除されます。

一般的なフィルターを装着したピペットチップ



ARTバリアを組み込んだピペットチップ



目的

キャリーオーバーコンタミネーションを完全に防止することは極めて重要であるため、ラボでの使用状況を直接反映できる条件でARTバリアチップの有効性をテストすることが必要です。以下の実験は、ARTバリアチップが提供できるコンタミネーション防止レベルを同定できるようにデザインされています。

材料および方法

実験 #1

プライマーペアSK-38/39 (HIV-1 gagゲノムの特異的オリゴヌクレオチドマーカ―) を含む標準的な50 μ LのPCRカクテル混合物を用意しました。ここに、50 μ LのHIV-1細胞溶解物を加えてポジティブコントロールを、50 μ LのPCR試薬を加えてネガティブコントロールをそれぞれ作成し、100 μ LのPCR系で増幅反応を行いました。

30サイクルのPCR増幅後、SK-38/39の増幅産物に32P-標識SK-19プローブをハイブリダイズさせました。その後、ハイブリダイズした混合物を10%PAGEゲル上で分離し、オートラジオグラフィーで検出しました。

事前に増幅したHIV-1 DNAの50 μ LのサンプルをARTセルフシーリングバリアチップを取り付けたピペットで吸引排出し、エアロゾルの生成を最大化させました。その後、ピペット先端部を滅菌水50 μ Lで洗浄し、洗浄液をPCRカクテル混合物に添加し、HIV-1の検出用に増幅しました。

同様の操作を、100 μ L、150 μ Lおよび200 μ LのHIV-1 DNA増幅サンプルおよびARTピペットチップを使用して行い、さらに50 μ LのHIV-1 DNAサンプルおよびフィルターなしのピペットチップを使用して行いました。

PCRカクテル混合物の調製に用いた試薬がHIV-1コンタミネーションの起源とならないことを確認するため、PCRカクテル混合物50 μ Lを滅菌水50 μ Lに添加し、PCRにより増幅しました。

ピペット先端部が以前の実験由来のHIV-1で汚染されていないことを実証するために、シャフトを滅菌水50 μ Lに浸漬して洗浄し、その洗浄液をPCRカクテル混合物に添加してPCRで増幅しました。本アッセイでは、100万個の末梢血単核球細胞のバックグラウンド中でわずか1〜10コピーのHIV-1を検出することが可能です。

実験 #2

y標識ATP (396,773 cpm/ μ L) の水溶液50 μ Lを、ピペットにより繰り返し吸引排出し、ピペットチップ内にエアロゾルを発生させました。その後、ピペット先端部を湿らせたろ紙ディスクで拭き取り、そのろ紙を放射能測定用のシンチレーション液に浸漬させました。

表1に示すデータでは、カウント数からシンチレーションカクテルに起因するバックグラウンドが差し引かれています。バリア (フィルター) の両側の放射性コンタミネーションを測定するために、バリアを半分に切断し、各切片をシンチレーション用液体中に浸漬してカウントしました。

実験 #3

ピペット操作が不適切であったり、正しくキャリブレーションされていないピペットを使用したりすると、放射性同位元素、増幅DNA、または感染性物質などの液体の吸い込みによってピペットの先端部が汚染される可能性があります。ピペットチップ中のさまざまなエアロゾル遮断フィルターの有効性を評価する試験を開発しました。ピペットチップへのインサート (フィルター) として、綿栓、結合セルロースファイバーフィルターおよびARTセルフシーリングバリアの3種類を選択しました。ピペットチップ中の3種類の異なるフィルター上に、y標識ATP/赤色色素混合液20 μ Lを添加しました。

上記のピペットチップはラック中に設置しました。水溶液20 μ L (赤色の食用色素と混合したy標識ATP、396,733 cpm/ μ L) をチップインサートの上部に添加しました。

フィルターへの赤色色素の吸収を観察し、記録しました。放射性物質の吸収は、インサートを半分に切断し、各切片をシンチレーション用液体中に浸漬して測定しました。表2に示すデータでは、カウント数からシンチレーションカクテルに起因するバックグラウンドが差し引かれています。残りの放射性同位体カウントは、ピペットチップ上部およびフィルターの液体側に存在する放射性物質に相当します。

結果

実験 #1

図1 (レーン1) に示すように、HIV-1細胞溶解物のPCR増幅により、オートラジオグラフィーで115 bpに検出される特異的な産物が得られます。従来のフィルターなしのピペットチップを取り付けたピペットの先端部の洗浄に使用した滅菌水の増幅により、同一のHIV-1特異的な産物が検出されました (レーン8)。これは、ピペット操作によって発生したエアロゾルがピペットを汚染し、その後のサンプルに導入される可能性があることを示しています。

レーン2およびレーン3はネガティブコントロールとなります。レーン2には、HIV-1特異的シーケンスが認められなかったため、PCR試薬がHIV-1のコンタミネーション源ではなかったことが示されています。同様に、レーン3にもHIV-1コンタミネーションが検出されなかったことから、以前に行われたHIV-1の実験によるコンタミネーションがピペット先端部に存在しないことが示されました。

レーン4〜7に示すように、ARTバリアチップで保護されているピペット先端部にHIV-1コンタミネーションは検出されませんでした。ARTバリアチップは、4つのサンプルそれぞれによるキャリーオーバーコンタミネーションを100%防止しました。

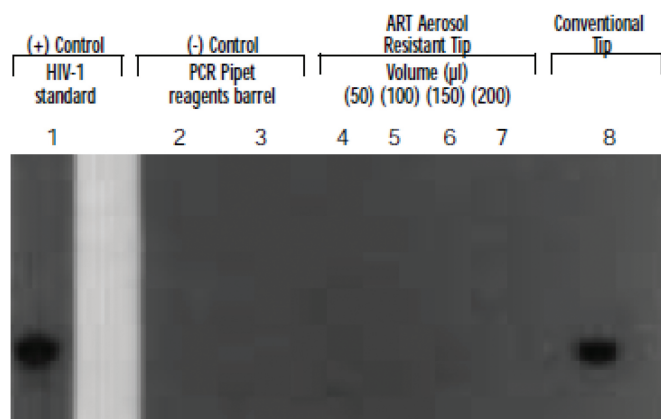


図1
ARTチップを用いた従来の空気置換式マイクロピペットのHIV-1エアロゾルコンタミネーションの評価

HIV-1のgag遺伝子プライマーペアSK38-39を含むPCR反応ミックスの増幅後、オートラジオグラム上にはHIV-1特異的産物が観察されます。各細胞に1コピーのHIV-1プロウイルスDNAを含む細胞株85-14-F2を使用して、200万のノーマルPBMCのバックグラウンド中でHIV-1標準物質を作成しました。115 bpサイズのHIV-1特異的産物が観察されています (レーン1)。PCR増幅試薬のみ (レーン2) またはピペット先端部洗浄液の滅菌水 (レーン3) をネガティブコントロールとしました。エアロゾル耐性チップを用いて、50 µL~200 µL (レーン4~7) のHIV-1増幅産物 (レーン1) のピペットでの吸引排出を繰り返し行いました。ピペット先端部からの無菌洗浄液をPCRで増幅しました。従来のフィルターなしのピペットチップを使用した場合 (レーン8)、HIV-1コンタミネーションが観察されました。

実験 #2

表1に示すように、ARTバリアチップを使用すると、ピペット先端部またはバリア (フィルター) のピペット側には放射能は検出されませんでした。ただし、アイソトープに曝露されたバリアの液体側には放射能が検出される可能性があります。これらの結果は、ARTバリアチップが、放射性同位元素の取り扱いを必要とするラボのアプリケーションにおけるエアロゾルコンタミネーションの防止に有効であることを証明しています。

表1 - ピペット先端部におけるエアロゾル化による放射性コンタミネーションの測定

フィルターなしの従来のピペットチップ (バリアなし)	ART (エアロゾル耐性チップ)
ピペット先端部で 122,993 CPM	ピペット先端部で0 CPM バリアのピペット先端部側で0 CPM バリアの液体側で170,920 CPM

実験 #3

赤色素は、ARTバリアを除き、試験したすべてのインサートに吸収され通過することが観察されました (表2)。表に示すように、放射能の検出は赤色素の位置と一致していました。

このことから、綿栓も結合セルロースフィルターも、これらの物質に対する有効なバリアとならないことが確認されました。ARTバリアチップのセルフシーリングバリアは、コンタミネーション物質の通過の遮断に有効でした。ARTバリアチップを使用した場合、赤色の液体がバリア表面と相互作用して、色素の透過を防止するシーリングゲルが形成されます。

表2 - 異なる物理的バリアを有するピペットチップ中の放射性物質と色素の混合物の測定

コンタミネーション物質の吸収	綿栓	セルロースプラグ	ART (エアロゾル耐性チップ)
赤色素	+	+	-
上部のCPM	5,196,738	4,633,054	7,199,755
底部のCPM	2,737,985	2,805,499	0
全CPM	7,934,723	7,438,553	7,199,755

考察

フィルターピペットチップは、キャリーオーバーコンタミネーションを防止して貴重なサンプルの品質を維持することを目的に開発されました。サーモフィッシャー製のARTセルフシーリングバリアチップの有効性を、実際のラボでの条件を再現した3つの実験により試験しました。

これらの試験では、ARTバリアチップはキャリーオーバーコンタミネーションを100%防止しました。これらの結果から、ARTバリアチップは、組織培養、血清学的アッセイ、法医学研究、核酸またはタンパク質ゲル電気泳動、PCRおよび放射能サンプルのピペット操作などのアプリケーションにおける、エアロゾルコンタミネーション、液体接触によるコンタミネーションおよびキャリーオーバー問題の防止に有効であることが示唆されます。

参考文献

1. Erlich, H.A. and Gelfand, D.H. and Saiki, R.K. Nature 331 (1988):461
2. Kwok, S. and Higuchi, R. Nature 339 (1989):237-238
3. Williams, J.F. BioTechniques 7 (1989):762-766
4. Gibbs, R.A. and Chamberlain, J.S. Genes Dev 3 (1989) 1095-1098
5. Kwok, S. PCR産物のキャリーオーバーを最小限に抑える方法 (Procedures to minimize PCR product carryover) In: Innis MA, Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. eds. PCRプロトコル: 方法とアプリケーションに関する指針 (PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications) : San Diego: Academic Press, 1990:142-145
6. OU, C.Y. et al Science 239 (1989): 295-297

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

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。

© 2020 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 LHC017-A20090B

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

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

オーダーサポート TEL : 03-6832-9260 FAX : 03-6832-9261

営業部 TEL : 03-6832-9270 FAX : 03-6832-9271

facebook.com/ThermoFisherJapan

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

thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC