

エアロゾルをブロックする ピペットチップによるサンプル品質の維持

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に関して、PCRに使用した際のサンプル品質維持能力を評価するためのテストを、独立した検査機関で実施しました。

まず、当社独自のARTバリアのコンタミネーション防止能力のテストを実施し、他社のフィルターチップと比較しました。

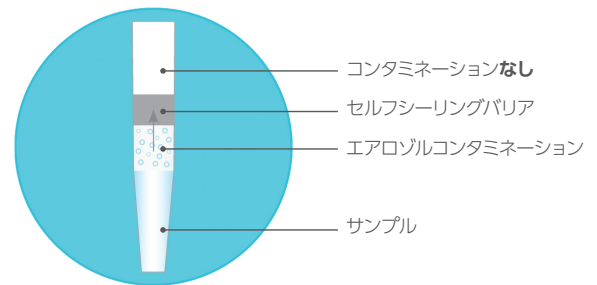
次に、ARTバリアに吸引された液体を回収する能力を測定しました。続いて、PCRに使用するサンプルが誤ってARTバリアに接触しても、PCRの品質低下や阻害が生じないことを示すためのテストが行われました。

はじめに

PCR条件およびサンプルの品質を維持することは極めて重要です。そこでサーモフィッシャーサイエンティフィックでは、コンタミネーションを防止し、再現性のあるサンプルデリバリーを提供できるARTセルフシーリングバリアチップを開発しました。

エアロゾルをブロックするピペットチップの選択においては、エアロゾルおよび液体によるピペットまたはその後のサンプルのコンタミネーションを防止する、ピペットチップの能力を考慮することが重要です。本テストでは、合計3社のピペットチップが使用されましたが、コンタミネーションを防止できたのはARTセルフシーリングバリアチップのみでした。

サンプルがチップのフィルターに接触した場合には、そのサンプルを回収することが必要になることがあります。ARTバリアチップがサンプルの残存量を最小限に抑える能力を証明するために、水を使用してサンプルの残存を定量化しました。



PCRは感度が極めて高いが故に、さまざまな要因により反応の品質が損なわれる可能性があります。このため、PCRを阻害しないまたは貴重なサンプルにコンタミネーションを引き起こさない、エアロゾルをブロックできるチップを使用することが重要となります。ARTセルフシーリングバリアチップがPCRを阻害しないことを実証するために、独立した検査機関において、実際のラボにおける条件を再現したプロトコルを用いて、ARTバリアチップの評価が行われました。

目的

独立した検査機関における試験により、ARTセルフシーリングバリアチップのみがエアロゾルおよび液体コンタミネーションを効果的に防止し、サンプルの保持を最小限に抑えること、さらに当社独自のARTバリアを適切に使用した場合にはPCR阻害が生じないことを実証します。

材料および方法

実験 #1 - コンタミネーション試験

試験に使用するすべてのブランドのすべてのチップがコンタミネーションフリーであることを確認するために、試験前にヒトDNAの有無の検査が行われました。

サンプルからピペットへのコンタミネーション

Gilson™ Pipetman™ P-200のピペットを用いて、血液由来の全ヒトゲノムDNA 20 ngを含む増幅前のPCRミックス200 μLを、異なる3種類のブランドのエアロゾルをブロックするフィルターを通過させて、吸引（可能な場合）しました。続いて、DNAフリーのチップを用いて、フィルターのピペット側から液体を採取しました。

ピペットからサンプルへのコンタミネーション

異なる3種類のブランドの、エアロゾルをブロックするピペットチップ（20 μL）のフィルター上に、2 μLのDNA（10 ng/μL）を分注しました。次に、Pipetman P-200を200 μLに設定して、約20 μLのdH₂Oをフィルターを通過させて吸引（可能な場合）し、DNAサンプルと接触させました。

いずれの試験でも、得られた液体について、ヒトAlu遺伝子に特異的なプライマーを用いたPCR法によりDNAの有無を調べました。サーマルサイクル条件は、94℃（1分）、40℃（1分）、72℃（1分）を40サイクルとしました。

得られたPCR産物を、1.2%アガロースゲルおよび1X TAEを用いて解析しました。

実験 #2 - サンプル保持試験

10本のART 20 μLチップの各重量を測定し、初期重量としました。次に、40 μLの水を過剰吸引して意図的にバリアに接触させ、迅速に排出しました（迅速に排出することで、バリアが密封状態を形成する前にサンプルを回収することができます）。次に各チップの重量を測定し、残存する水の量を同定しました。

実験 #3 - PCR 阻害試験

60 μLに設定したPipetman P-200を用いて、dH₂Oを20 μLのARTバリアチップに吸引しました。ARTバリアに接触させた後、抽出液を回収し、その20 μLをTaq DNAポリメラーゼ（2.5 U）、ヒトAlu遺伝子のプライマー、30 pgヒトゲノムDNAテンプレート、PCR緩衝液（10 mM MgCl₂）による30 μLのPCR反応に使用しました。合計10本のARTチップの試験をこの方法で行いました。ネガティブコントロールおよびポジティブコントロールによる試験も行いました。

サーマルサイクル条件は、94℃（1分）、40℃（1分）、72℃（1分）を40サイクルとしました。得られたPCR産物を、1.2%アガロースゲルおよび1X TAEを用いて解析しました。

結果

実験 #1

ARTバリアのセルフシーリングという性質のため、DNAはいずれの方向にも通過できませんでした。その結果、最終解析ではDNA産物が検出されませんでした（図1）。一方、ブランドBおよびブランドCによるDNAコンタミネーションの存在から、残りの2つのフィルターチップではDNAが両方向にフィルターを透過したことが示されています。

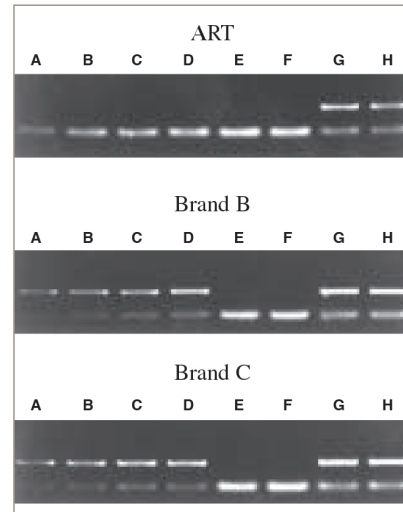


図1
全ゲル写真に関して、レーンA、B：サンプルからピペットへのコンタミネーション - DNAがバリアを通過；レーンC、D：ピペットからサンプルへのコンタミネーション - DNAがバリアを通過して排出；レーンE、F：ネガティブコントロール；レーンG、H：ポジティブコントロール

実験 #2

ARTバリアチップの各重量を測定したところ、過剰吸引後にサンプルの平均96.9%が回収され、最大98.5%が回収されたことがわかりました（表1）。

表1

ART チップ	サンプル 回収率 (%)
1	98.0
2	97.5
3	98.5
4	96.3
5	96.5
6	97.0
7	95.5
8	95.0
9	97.3
10	97.0
平均値	96.9%

実験 #3

図2からは、当社独自のARTバリアの材質がPCRを阻害しないことが示されています。ARTバリアと接触したdH₂Oを利用して得られたPCR産物は、ポジティブコントロールと同等のバンド強度を示しています。

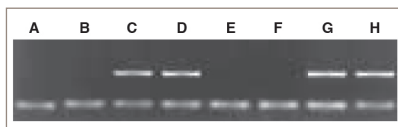


図2

サンプル - レーンA、B: ARTバリアと接触した水を使用した、DNAを含まないPCR反応ミックス; レーンC、D: ARTバリアと接触した水を使用した、DNAを含むPCR反応ミックス

コントロール - レーンE、F: DNAを含まないPCR反応ミックス; レーンG、H: DNAを含むPCR反応ミックス

考察

PCRのような高感度の反応では特に、正確な実験結果を得るために、サンプルの品質を維持することが極めて重要です。ラボで使用する、エアロゾルをブロックするチップの選択においては、キャリーオーバーコンタミネーションを防止する能力を評価することが重要です。

実験#1からは、多孔性プラスチックフィルターを利用してエアロゾルをブロックするチップでは、溶液中でDNAが両方向に通過できることが示されました。ARTバリアチップのみが、このようなコンタミネーションの防止に必要なセルフシーリング機能を備えています。

実験によっては、高価な試薬や入手が極めて困難なサンプルが必要となる場合があります。ARTバリアチップでは、サンプルが万が一過剰吸引されてARTバリアに接触したとしても、容易にサンプル回収が可能です。実験#2では、過剰吸引されたサンプルの最大98.5%が回収されたことがデータから示されています。

多数の因子によって、PCRの阻害を引き起こす可能性があります。これらの因子には、過剰な試薬または特定の環境条件への曝露が含まれます。実験#3からは、ARTピペットチップのセルフシーリングバリアが、標準的な条件下でPCRの品質低下を引き起こすこともPCRを阻害することもないことが実証されました。

最後に、フィルターがサンプルに接触するリスクが存在する場合には常に、サンプルがフィルターに接触した時点でそれを検知できる安全性が、すべてのフィルターチップシステムにおいて最も重要な利点となります。ARTセルフシーリングバリアチップは、サンプルがフィルターに接触したことをユーザーに知らせるためにバリアが完全に密閉される唯一のチップです。バリアが密閉されることで、サンプルコンタミネーションの可能性が自動的にユーザーに警告されます。

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.

"Pipetman" (Gilson) is a trademark of its respective owners.

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 LHC019-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