

Minimizing contamination

ARTバリアチップのキャリーオーバーコンタミネーションおよびクロスコンタミネーション防止効果

目標

本研究は、実験室でのピペット作業中のエアロゾル化粒子またはオーバーピPETTINGの液体通過のいずれかによる、ルーチンのピPETTINGによって引き起こされるクロスコンタミネーションの予防において、**Thermo Scientific™ ART™ バリアチップ**のセルフシーリング性能が非常に重要であることを示します。

背景

マイクロピPETとチップは、研究室向けの最も普遍的な器具の一つといえます。ピPETとチップの最適な組み合わせは、科学者が重要な仕事を行う際に欠かせないツールです。

マイクロピPETチップは、DNA単離、配列決定、NGSアプリケーション、哺乳類細胞培養、微生物学アプリケーション、製造および品質試験アプリケーション、RT-qPCRアプリケーション、SARS-CoV-2感染検査など、無数の実験室のリキッドハンドリングプロセスに不可欠です。

PCRの成功は反応の完全性に大きく依存します。いかなるクロスコンタミネーションも、外来性核酸の増幅をもたらす、偽シグナルを導く可能性があります。偽シグナルの一般的な原因は、増幅されたDNAをある試験管から別の試験管へ、またはあるサンプルから他の形態のサンプルへの汚染を持ち込むことで起こります。ピPETTINGの動作によりエアロゾルまたは液体の通過が生じ、それがピPETに吸い込まれた後、その後のサンプルに移され、キャリーオーバーコンタミネーションが生じることがあります。キャリーオーバーおよびクロスコンタミネーションは、誤った結果をもたらすリスクを高めるだけでなく、トラブルシューティングに伴うコストや実験計画の遅延も引き起こします。

これらの影響は、貴重な時間と資源の喪失をもたらすリスクがあります。クロスコンタミネーションによって誤った結果を導き、検査室の信頼性に回復不能な損傷を引き起こす可能性が発生します。

ピPET操作中に発生するエアロゾルによるクロスコンタミネーションを防止するために、PCR、細胞培養、微生物学関連のワークフローを実施する場合には、フィルター付きピPETチップが好ましいと言われています。しかし、全てのフィルターマイクロピPETチップが等しく作られているわけではなく、信頼できる再現性の高い結果のためには、適切なフィルターチップを選択することが必要です。

セルフシーリングバリア機能

ARTバリアチップは、ピPET操作中に引き起こされるキャリーオーバーおよびクロスコンタミネーションの発生を一切排除する、独自のセルフシーリングフィルターを備えた普遍的なチップです。

ARTバリアチップの主な特長は、ピPET先端部とチップの開口部の間に位置する、多孔性でセルフシーリング性の物理的障壁です。これにより、エアロゾルまたは液体の汚染を不可能にし、いかなるキャリーオーバーまたはクロスコンタミネーションの発生源を防止します。

ARTバリアフィルターは、検査室スタッフによる誤った過剰容量ピPETTINGの稀なアクシデントにおいても、汚染を排除するのに役に立ちます。当社では、セルフシーリングバリア機能を有するARTバリアチップを、フィルターではなくバリアと位置づけています。

科学者は、キャリーオーバーとクロスコンタミネーションのリスクを管理するために、さまざまな対策を講じていますが、実験中に起こりうる不注意や人的ミスは完全に予期することは不可能です。多くの科学者は、ピペッティングやチップの選定、容量設定を誤るといった経験を持っています。このようなミスは、特に多忙なタイムラインおよび目標達成のためのストレス下で作業する場合、よくみられます。

これらのミスは、ワークフローにてキャリーオーバーまたはクロスコンタミネーションの原因となる可能性があり、信頼性の低い結果およびピペットの除染にかかるコストとダウンタイムを引き起こします。特にSARS-CoV-2検査を実施している施設やヒト同定 (HID) ワークフローを実施している検査ラボなど、存在量の少ない標的物の検出に取り組む検査室では特に困難な場合があります。

ピペットの汚染は、PCR関連ワークフローにおいて誤った結果が発生する主な原因の1つです。コンタミネーションが確認された後に必要な、汚染されたピペットの除染と再キャリブレーションを行う時間も損失と言えます。

本アプリケーションノートの主目的は、キャリーオーバーおよびクロスコンタミネーションの防止に、当社のARTバリアチップのセルフシーリング機能が重要であることを示すことです。そのため、Applied Biosystems™ TaqCheck™ SARS-CoV-2 Control RNAを用いた、過剰容量吸引試験により他3社のチップを対照して、ARTバリアチップを評価し、実際のラボで発生する可能性のある誤ったピペットインスタンスをモデル化しました。

材料および方法

本試験で使用した製品を表1および表2に要約します。

表1. 試験したピペットチップ

ブランド/社名	製品	製品番号
Thermo Scientific	ART 20P、フィルター、滅菌済み、ヒンジ付きラック	2149P-HRPK
	ART 200、フィルター、滅菌済み、ヒンジ付きラック	2069-HRPK
A社	0.5~20 µL、フィルターチップ、滅菌済み、ユニバーサル	
	1~200 µL、エアゾールフィルターチップ、滅菌済み、ユニバーサル	
B社	20 µL、フィルター、滅菌済み、ユニバーサル	
	200 µL、フィルター、滅菌済み、ユニバーサル	
C社*	0.2~20 µL、フィルター、滅菌済み	

*C社の200 µLのチップは、試験の条件を満たすことができないため試験されなかった。

表2. 試薬および器材

ブランド	製品名	製品番号
Applied Biosystems	Applied Biosystems™ TaqMan™ Control Genomic DNA (human)	4312660
	Applied Biosystems™ TaqCheck™ SARS-CoV-2 Control Dilution Buffer	A50486
	Applied Biosystems™ TaqCheck™ SARS-CoV-2 Control	956127
	Applied Biosystems™ TaqCheck™ SARS-CoV-2 Fast PCR Assay	A47693
	Applied Biosystems™ TaqPath™ 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG	A15300
	Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical 384-Well Reaction Plate with Barcode	4309849
	Applied Biosystems™ MicroAmp™ Optical Adhesive Film	4311971
	Applied Biosystems™ MicroAmp™ Adhesive Film Applicator	4333183
Cytiva™	Whatman™定性濾紙:グレード 1サークル	09-805A
Thermo Scientific	Thermo Scientific™ Snap Cap Low Retention Microcentrifuge Tubes	3453PK
	Thermo Scientific™ Finnpipette™ Novus マルチチャンネルピペット	46300200
	Thermo Scientific™ Finnpipette™ Novus マルチチャンネルピペット	46300400

検査方法

ARTバリアチップと他3社のフィルターチップを比較し、性能を判定しました。これは、TaqCheck SARS-CoV-2 Control RNAを使い、ピペッティングを繰り返し行って、核酸 (RNA) を含むエアロゾルまたは液体がピペットチップ内のフィルターを通過するかどうかを確認することによって行いました。適切なサイズにカットした濾紙ディスクをチップ内のフィルターの上に置いて、フィルターを通過する任意のエアロゾルまたは核酸を含む液体を捕捉しました。滅菌された穴開けパンチを用いて、各ピペットフィルターチップの内径に適合するようにWhatman™濾紙から円形ディスクを作製し、各チップ内のフィルターの上を完全に覆うようにディスクを作製しました。5/32インチ (4.0 mm) の濾紙ディスクを20 µLチップに装着し、3/16インチ (4.5 mm) の濾紙ディスクを200 µLチップに装着しました。濾紙ディスクを作製したら、紫外線下で滅菌しました。次に1 µLのヒトゲノムDNA (10 ng/µL) を各滅菌された濾紙ディスク上に分注し、室温で15分間空乾燥し、溶出コントロールとしました。その後、滅菌済みの鉗子を用いて、その濾紙ディスクを20 µLおよび200 µLフィルターチップのフィルターの上に直接設置しました。

チップのフィルターを通過したRNAの量は、[Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5 リアルタイムPCRシステム](#)のqPCR法で測定しました。

全ての実験ステップは、[Thermo Scientific™ 1300シリーズクラス II、タイプA2生物学的安全キャビネット](#)で無菌状態で実施しました。さらに使用した全ての装置、ピペット、ラボウエアは[Thermo Scientific™ RNase AWAY™ Surface Decontaminant](#)を用いて除染しました。

フィルターチップの評価

TaqCheck SARS-CoV-2 Control RNAは、SARS-CoV-2 SおよびN遺伝子の標的配列を含む合成RNAポジティブコントロールです。ワーキング溶液には、TaqCheck SARS-CoV-2 Control RNAを40倍に希釈し、TaqCheck SARS-CoV-2 Control Dilution Bufferを用いて作製したものを使用し、4社の20 µLチップと200 µLチップを使って4回試験しました。

過剰量のSARS-CoV-2 RNA作業溶液をチップに吸引しました。50 µLの容量を、Finnpipette Novus マルチチャンネルピペット、5~50 µLを用いて20 µLチップに吸引しました。300 µLの容量を、Finnpipette Novus マルチチャンネルピペット、30~300 µLを用いて200 µLチップに吸引しました。吸引時に、最大速度の設定で電動ピペットのミキシング機能を用いることにより、そのコントロールRNAを10回繰り返しピペッティングしました。これは、チップのフィルターを通過する可能性のあるエアロゾルまたは液体を作り出すために行われたものです。

事前に行った別の実験で、ミキシング機能を用いて繰り返しピペッティングするこの方法が、エアロゾルを十分に発生させることが観察されています (データは未揭示)。

RNA汚染の定量化

各フィルターチップについて行った後、濾紙ディスクをピペットチップから回収しました。この手順は、滅菌済みの鉗子を用いてバイオセーフティキャビネット内で実施し、作業中に汚染物質が混入しないように細心の注意を払って実施しました。回収した濾紙ディスクを滅菌済みRNase/DNaseフリーのマイクロチューブに入れ、室温50 µL、滅菌Tris-EDTA (TE) バッファー、pH 8.0で飽和させた。次いで、チューブをボルテックスし、室温で30分間インキュベートして、濾紙に結合した任意の核酸をTEバッファーによって溶出させました。インキュベーション後、溶出液を無菌の未使用のマイクロチューブに移しました。TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix、CG (4X)、およびTaqCheck SARS-CoV-2 Fast PCR Assay (20X) を用いて、濾紙ディスクに存在したと思われる溶出液中のSARS-CoV-2 RNAを増幅しました。

TaqCheck SARS-CoV-2 Fast PCR AssayはMultiplex RTqPCR Assayであり、SARS-CoV-2 RNAの並列検出に日常的に使用されており、SARS-CoV-2 NおよびS genes (VIC™ dye) およびhuman RNase P RPP30 gene (FAM™ dye) を標的としています。

FAM dyeを用いて、核酸溶出のコントロールとなるヒトゲノムDNAからRPP30の増幅を検出しました。トリPLICATEで増幅されたTaqCheck SARS-CoV-2 Control RNAの7ポイントの標準曲線を、1 X 10⁴コピー/µLから5コピー/µLの範囲の4倍希釈を用いて準備しました。ネガティブコントロール、TaqCheck SARS-CoV-2 Control RNAの1:40希釈物も調製しました。



表3. RT-qPCR反応設定に使用する試薬およびサンプル量

マスターミックス設定	
成分	反応あたりの容量 (μL)
TaqPath 1-Step RT-qPCR Master Mix, CG (4X)	2.5
Taq Check SARS-CoV-2 Fast PCR Assay (20X)	0.5
Molecular-gradeの水	2
マスターミックスの全量	5
反応プレートの設定	
成分	反応あたりの容量 (μL)
マスターミックス	5
サンプル*	5

*検体は標準の連続希釈液であり、Whatman濾紙ディスクから抽出した溶出液である。

表3に従って、マスターミックス5 μLをOptical 384-Well Reaction Plateのウェルに分注しました。これに続いて、5 μLの試験サンプルを5リプリケートで、または3 μLのMolecular-gradeの水を含む標準希釈系列2 μLをトリプリケートで加えました。Applied Biosystems™ MicroAmp™ Adhesive Film Applicator付きOptical Adhesive Film を使用してプレートをシールしました。

次に密封したプレートを穏やかにボルテックスし、1400 ×gで遠心分離して試薬を混合し、気泡を全て除去しました。その後、このプレートをQuantStudio 5 リアルタイムPCRシステムにセットし、QuantStudio DesignおよびAnalysisソフトウェアの手順に従ってRT-qPCR法を実施しました。この方法のサイクリングパラメーターを表4に示します。

表4. RT-qPCR反応のサイクリングパラメーター

ステップ	温度	Ramp速度	時間	サイクル数
リバーズ転写	50 °C	2.2 °C/秒	4 min	1
活性化	95 °C	2.2 °C/秒	2 min	1
変性	95 °C	2.2 °C/秒	1 s	
アニーリングと伸展	60 °C	1.8 °C/秒	20 s	50

結果

フィルターチップの評価

過剰量の吸引テスト中、全てのチップが液体を通過した時に目に見える兆候についても注意深く観察しました。ピペットに吸引された容量がチップの表示容量よりも大きかったため、試験した全てのチップでは、液体がフィルターの基部に接触していました。

ARTバリアチップは、液体がフィルターを通過しないように、設計通り封じ込められていることが明白でした。しかし、他3社のフィルターはこの液体が通過し、フィルターの上部に置かれた濾紙に接触してしまいました。この結果、SARS-CoV-2 Control RNAによって濾紙が汚染されました。このように他社のチップは誤ったピペット操作を行った場合、液体が目に見えて通過したことが実証されました。

RNA汚染の定量化

視覚的観察の結果を検証するために、RT-qPCR反応から得られた結果をQuantStudio DesignおよびAnalysisソフトウェアを用いて分析し、フィルターを通過する液体により、TaqCheck SARS-CoV-2 Control RNAによって濾紙が汚染されるかどうかを判定しました。定量サイクル (C_q) 値を、各試験チップの濾紙ディスクからの全ての溶出物について測定しました。C_q値は、検体の反応曲線がベースラインしきい値と交差するPCRサイクル数です。この値は、サンプルからの実信号の検出に必要なサイクル数に対応します。ソフトウェアは、C_q値を用いて、試験試料中に存在した標的核酸の量（この場合、ディスクからの溶出液）を計算します。C_q値は標的核酸の量と逆相関し、評価された試料中の標的のコピー数と相関します。このアッセイでは、SARS-CoV-2 NおよびS genes (VIC™ dye) のベースラインしきい値を0.01に、human RNase P RPP30 gene (FAM™ dye) を0.02に設定しました。

ARTバリアチップから採取した濾紙ディスクは、SARS-CoV-2 genesに対して陽性シグナルを示しませんでした。しかし、他3社のチップから採取した濾紙ディスクは、SARS-CoV-2 RNA genesについて陽性を示しました。これらの結果は、ARTバリアチップにはSARS-CoV-2 RNAによる汚染はないと言えますが、他3社のチップはこの試験を合格しませんでした。チップのフィルターの上に置かれた濾紙ディスクが汚染されていたという目視観察を裏付けるものといえます。

全ての試料がhuman RPP30に対して陽性であったことから、溶出コントロールとして用いたhuman DNAの存在が示され、これにより濾紙からの結合核酸の効率的な溶出が確認されました(図1)。

RT-qPCRアッセイの結果は、ARTバリアチップがTaqCheck SARS-CoV-2 Control RNAのキャリアオーバーコンタミネーションの発生を予防することに成功しましたが、他社のフィルターチップは十分な機能を示しませんでした。

表5. SARS-CoV-2 RNAによる過剰容量試験の結果

チップ	SARS-CoV-2汚染の存在
ARTバリアチップ, 20 µL	合格 (陰性)
ARTバリアチップ, 200 µL	合格 (陰性)
A社チップ, 20 µL	不合格 (陽性)
A社チップ, 200 µL	不合格 (陽性)
B社チップ, 20 µL	不合格 (陽性)
B社チップ, 200 µL	不合格 (陽性)
C社チップ, 20 µL	不合格 (陽性)

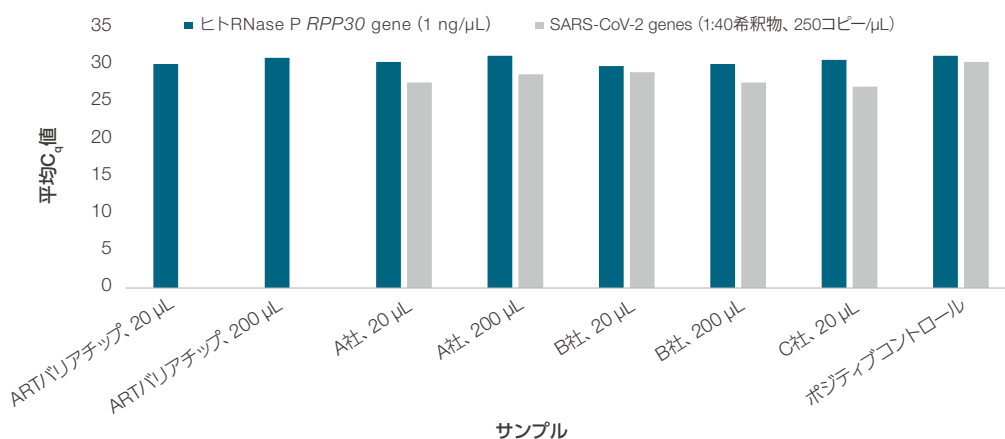


図1. 試験した溶出液中の核酸の平均Cq値ARTバリアチップのみがSARS-CoV-2 RNAの存在を示さなかったが、他3社のチップはRPP30コントロールと同様のレベルでSARS-CoV-2 genesの増幅を示した

結論

科学者はピペットの定期的な使用において、コンタミネーションリスクの影響を認識しなければなりません。サンプル汚染は、研究分野にかかわらず、結果として得られるデータに有害となる可能性があります。したがって、キャリーオーバーおよびクロスコンタミネーションを防止することは、世界中の科学者にとって非常に重要です。

ARTバリアピペットチップは、ピペットを保護しながら重要なサンプルの汚染の防止や高感度アッセイとの併用に理想的といえます。ARTバリアチップは、大量のサンプルを扱う研究室では非常に重要なものとなりえます。この研究で示したように、正確な同定に重要な役割を果たしています。これは、ARTバリアチップがエアロゾルや液体の汚染に対して最大100%の防護効果を示したからです。

ARTバリアチップは、液体サンプルやエアロゾルがピペットのノーズコーンに接触するのを防ぐために完全に密閉するセルフシーリングバリア機能を備えた唯一のチップです。

これにより、ピペットとその後のサンプルがキャリーオーバーおよびクロスコンタミネーションから保護されることが保証されます。

- ARTバリアチップのみが、SARS-CoV-2 RNA液体およびエアロゾルのフィルター通過を防止し、キャリーオーバーコンタミネーションを回避する能力を実証したが、評価した他3社のチップは不合格だった。
- 今回試験したARTバリアチップのセルフシール能力は、過剰量ピペッティングが誤って行われた場合でも、液体の通過に対して100%の保証を提供することが証明された。
- ARTバリアチップは、科学者がキャリーオーバーコンタミネーションやクロスコンタミネーションの可能性を回避することを実証したひとつの手段である。

- ARTバリアチップは、高価なトラブルシューティングや、手間のかかる器具の除染や再キャリブレーションによって引き起こされる実験計画の遅延を避けるために有用といえる。
- 複数の製造拠点を持つ当社は、サプライチェーンの安定性を保証し、科学におけるパートナーにより良いサービスを提供する。
- ARTバリアチップは、業界最高水準 (ISO 9001および13485) に従って製造され、以下の基準を満たすことを保証：
 - ISO 11137 (最小無菌性保証水準 (SAL))
 - エンドトキシンフリー
 - Human DNAフリー
 - RNaseフリー
 - DNaseフリー
 - PCR inhibitorフリー



詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/ART

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。これらの製品は一般的なラボでの使用を目的としています。製品の性能がお客さまの用途やアプリケーションに適しているかどうかはお客さま自身でご確認ください。

© 2024 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

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

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

Cytiva and Whatman are trademarks of Cytiva.

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 LHC060-A24070B

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

お問い合わせはこちら thermofisher.com/contact

thermo scientific