

Low DNA Binding スナップキャップマイクロチューブによる DNA 完全性の維持

はじめに

定量PCR (qPCR) は、遺伝子発現解析から法医学のワークフローにおけるヒト同定までの応用範囲で、非常に汎用性の高い分子生物学的技術です。従来のPCRにおけるエンドポイント測定とは異なり、qPCRは、各増幅サイクルにおけるDNA定量を可能にする蛍光レポーター色素を用いて実施されます。qPCRはまた、通常のPCRよりも広いダイナミックレンジを有し、ゲノムDNA (gDNA) の約 10^{11} コピーから1反応あたりの1コピーまで多岐にわたります。

典型的なqPCRアッセイには、アッセイの定量範囲に及ぶ既知のDNA濃度を持つ校正標準が含まれます。qPCRシステムソフトウェアは、検量線ごとに対応するDNA濃度 (コピー数/ μL) の $\log_{10}$ に対して閾値サイクル (C_t) をプロットすることで、検量線を作成します。次に、実験的に求めた C_t 値に基づいてサンプル中のDNAを定量でき、方程式1を用いて最適な線の傾きから増幅効率を推定できます。

$$\text{方程式 1 } \text{Efficiency} = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$$

信頼性の高い標準液を用いることは、増幅効率の正確な定量化および解釈にとってきわめて重要ですが、DNAを吸着するチューブで標準物質が調製または保存されている場合、これが困難または不可能になることがあります。DNAの吸着 (結合) は、標的濃度が10 コピー/ μL と低い定量範囲の下限で特に問題となることがあります。このような低濃度では吸着による損失は無視できません。これは、誤差が全てのqPCRサイクルで伝播するからです。

1反応あたりのアンプリコンの数は、増幅効率を100%と仮定すると、全てのqPCRサイクルで理論的には2倍になるはずである。しかし、標準液における有効DNA濃度が吸着により低下すると、実際よりも増幅効率が低く現れる。

特に法医学のワークフローでは、ヒトDNAコンタミネーションのリスクを最小限に抑えることも重要です。法医学研究所では、標的DNAがほとんど含まれていないサンプルを扱うことがよくあります。qPCR中のヒトDNA汚染物質の増幅による蛍光は、標的DNAの増幅から蛍光性を圧倒し、法医学的分析を完全に無効にする可能性があります。法医学研究所は、製造工程からヒトDNAのコンタミネーションのリスクを最小限に抑え、高品質の製品を安定供給できるメーカーを重視しています。

このアプリケーションノートでは、Low DNA Binding スナップキャップマイクロチューブ (MCT) の性能評価について説明しています。このMCTのDNA吸着およびヒトDNAコンタミネーションについて評価し、他の6社のMCTと比較しました。



Thermo Scientific™ Low DNA Binding Snap Cap Microcentrifuge Tubes および Thermo Scientific™ Low DNA Binding Snap Cap Microcentrifuge Tubes, Sustain™ シリーズは、研究、製薬、法医学などの用途で核酸の完全性を維持するために開発されました。



材料および方法

DNA吸着実験

Applied Biosystems™ TaqMan™ Control Genomic DNA (製品番号 4312660) およびInvitrogen™ Nuclease-Free Water (製品番号 AM9930) を用いてヒトgDNA希釈系列を調製しました (表1)。各溶液を1分間ボルテックスした後、次の希釈液を調製しました。ヌクレアーゼフリー水のみを用いて、テンプレートなしのコントロール (NTC) も調製しました。

表1. DNA吸着実験のためのgDNA希釈系列の準備

gDNA添加量	水 (μL)	最終gDNA濃度 (pg/μL)	濃度識別ID	gDNAコピー数/9 μL ※1
5.5 μL 10 ng/μL ストック	1,494.5	36.7	DNA-3	100
150 μL DNA-3	1,350	3.67	DNA-2	10
150 μL DNA-2	1,350	0.37	DNA-1	1
0	1,350	0	DNA-0	0

※1 希釈スキームは、9 μLが翌日のqPCRによるgDNAの定量に用いられるため、9 μL当たりのgDNAコピー数に基づいていた。ヒトgDNAの1コピー=3.3 pg。

-80 °Cで一晩保存するMCTのラベル標識と構成

Low DNA BindingスナップキャップMCT1.5 mLおよび他社のLow Binding 1.5 mLのMCTには、表1に示す濃度識別IDを標識しました。テストリプリケートは、同じ会社の4つのMCTで構成され、DNA-0、DNA-1、DNA-2、およびDNA-3とラベル標識しました。各MCTは、ストレージラック内で会社ごとに、テストリプリケートにグループ化され、対応する濃度識別IDで標識された各MCTに55 μLの希釈gDNAをアリコートしました。

MCTを-80 °Cで24時間保存し、その後数日間、このプロセスを繰り返し、合計3ラックのMCTを調製しました。統計的に有効なサンプルサイズを得るために調製されたリプリケートの総数を表2に示します。会社ごとに少なくとも9つの複製を用意しました。データセットのサイズを大きくするために、A社、B社、およびF社のMCTを用いて追加のリプリケートを準備しましたが、最終的には分析にほとんど影響を及ぼしませんでした。

表2. DNA吸着実験のために-80°Cで一晩保存したテストリプリケート

MCT	リプリケート数
Low DNA Binding スナップキャップ MCT	18
A社のMCT	12
B社のMCT	9
C社のMCT	12
D社のMCT	9
E社のMCT	9
F社のMCT	12

qPCR

-80 °C での保管中のMCTに吸着したgDNAの損失を定量するために定量PCRを実施しました。qPCRのマルチチャネルピペッティングを容易にするために、アリコートはMCTから12ウェルストリップチューブの個々のウェルに移し替えました。表1で示されているように、新鮮なgDNA希釈系列も、qPCRを行った日にLow DNA Binding MCTを用いて調製しました。これらのチューブからのアリコートをポジティブqPCRコントロールとしました。

15 mLコニカルチューブに、Applied Biosystems™ TaqMan™ Universal Master Mix II, No. UNG (製品番号 4440043) 3.60mLと、Applied Biosystems™ TaqMan™ single-tube human RNase P Assay (製品番号 4316831) 230 μLを混合しました。qPCRプレートは、この混合液11 μLを個々のウェルに分注し、-80 °Cで保存されたMCTから9 μLまたは新たに調製されたgDNAから9 μLを加えて準備しました。DNA-1、DNA-2、またはDNA-3と標識された反応液は、それぞれ1、10、または100コピーのgDNAを含んでいました (表1)。qPCRは、表3に示されたサイクリングパラメーターを使用してApplied Biosystems™ QuantStudio™ 6 Flex リアルタイムPCRシステムで実行しました。

表3. DNA吸着実験のqPCRサイクリングパラメーター

温度	時間	サイクル
50 °C	2 分	1
95 °C	10 分	1
95 °C	15 秒	40
60 °C	1 分	

qPCRは、MCTからのアリコートを他の2つのラックに一晩 -80 °Cに保管して、翌日に実行しました。毎日新鮮なgDNA希釈系列を準備し、それらのチューブからのアリコートをポジティブコントロールとしました。

データ解析

平均 C_t は、各社からMCTについて各gDNA濃度で計算し、gDNA濃度の $\log_{10}$ に対してプロットしました。Microsoft™ Excel™におけるLINEST関数を用いて、各社からMCTに対する最適な直線統計を求め、qPCR増幅効率を方程式1を用いて算出しました。また、各社のMCTについても、それぞれの増幅効率に傾きの誤差の $\ln(10)$ 倍を乗じて伝播誤差を計算しました。

ヒトDNAコンタミネーションのアッセイ

18の異なるロットからのLow DNA BindingスナップキャップMCT (n=180) について、ヒトDNAコンタミネーションを試験しました。MCTは、MCT容量 (0.6 mL、1.5 mL、または2.0 mL) によって指定された3つのバッグのうちの1つに入れました。同じバッグ内のMCTをランダムに除去し、各10個のMCTの6つのグループに分類しました。各グループの100 μ Lのヌクレアーゼフリー水のアリコートをして1つのMCTに加えました。MCTを1分間ボルテックスし、アリコートをした同じグループの別のMCTに移しました。このプロセスを、同じ100 μ Lの水でボルテックスされたグループ内の全10個のMCTが終了するまで繰り返し、アリコートを含む最後のMCTを90 °Cで10分間インキュベートしました。

第三者機関では、アリコートのヒトDNAコンタミネーションの検査のため、qPCRを実施しました。qPCR反応には、Applied Biosystems™ AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase with Buffer II and $MgCl_2$ (製品番号 N8080249) を使用しました。ヒト口腔DNAを用いてポジティブコントロールサンプルを調製し、ネガティブコントロールはPCRグレードの水で調製しました。qPCRを30 μ Lを含む個々のウェルで32サイクル実施しました。次に、qPCR産物をゲル電気泳動により分析し、ヒトDNAコンタミネーションが存在するかどうかを調べました。アッセイの検出限界は1 pg DNA (0.03 pg/ μ L) で、通過基準は<5 pgヒトDNAでした。

結果

DNA吸着実験

qPCR増幅効率は各社全体で103%から115%の範囲でした (表4)。Low DNA BindingスナップキャップMCTに保存したアリコートによるqPCR増幅効率は、この範囲の中央で、108.2%でした。関連する伝播誤差は24.1%で、1.1%~59.2%の範囲の中央付近に収まった。これらの結果から、Low DNA Binding Snap Cap MCTは、吸着による大きな損失がなく、1反応あたり1コピーまでヒトgDNA qPCR標準試料を-80 °Cで短期保存に使用できることが示されました。

表4. -80 °Cでの保存中のMCTへの吸着によるgDNA損失を評価するためのqPCRの結果

MCTs	平均 C_t			R^2	傾き	qPCR効率	伝播エラー
	DNA-1	DNA-2	DNA-3				
ポジティブコントロールMCT	37.2	33.8	30.7	0.9994	-3.25	103.3%	19.5%
Low DNA BindingスナップキャップMCT	37.1	34.1	30.8	0.9991	-3.14	108.2%	24.1%
A社のMCT	37.0	34.2	30.8	0.9954	-3.12	109.3%	53.2%
B社のMCT	36.9	34.3	30.9	0.9945	-3.02	114.5%	59.2%
C社のMCT	37.2	34.1	30.8	0.9996	-3.21	105.0%	16.0%
D社のMCT	37.1	34.0	30.8	1	-3.17	106.9%	1.1%
E社のMCT	37.0	34.1	30.8	0.9994	-3.12	109.0%	19.3%
F社のMCT	37.4	34.2	30.9	0.9999	-3.24	103.7%	6.8%

ヒトDNAコンタミネーションのアッセイ

アッセイの結果は、全てのLow DNA BindingスナップキャップMCTが<5 pgヒトDNAの基準を満たしたという結論を示しました。代表的な電気泳動ゲルを図1に示します。

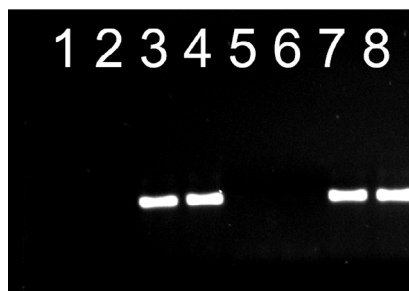


図1. ヒトDNAコンタミネーションアッセイの代表的な電気泳動ゲル
レーン5および6にMCT試験サンプルを充填した。予想通り、ヒトDNAは検出されなかった。サンプルレーン7および8に充填し、PCR阻害を試験した。予想されたサイズと強度のバンドが検出され、PCR阻害が起こらないことを示した。レーン1および2：ネガティブコントロール、レーン3および4：ポジティブコントロール。

結論

Low DNA BindingスナップキャップMCTにおける-80 °CでのヒトgDNAの短期保管は、非常に低いgDNA濃度でも、qPCR効率に有意な影響を及ぼしませんでした。また、ヒトDNAコンタミネーションのアッセイにおいて<5 pgヒトDNAの基準を満たしました。本実験の結果は、Low DNA BindingスナップキャップMCTが、他社のLow DNA Binding MCTと同様に、またはそれよりも優れていることを実証します。これらは、正確なqPCR標準物質およびヒトDNA汚染物質のないMCTを必要とする高感度法医学ワークフローでの使用に適しています。

詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/low-dna-binding-mct

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。製品の性能がお客様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様自身でご確認ください。

© 2025 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

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

Microsoft and Excel are trademarks of Microsoft Corporation.

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 **LHC506-A25020B**

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