

Consumables

NuncおよびABgeneポリプロピレン製マイクロプレートのDNA吸着性に関する評価

まとめ

- Thermo Scientific™ Nunc™およびABgene™ ポリプロピレン製マイクロプレートには、DNA吸着が低いポリプロピレン樹脂を採用しています。
- マイクロプレートへのDNAの吸着に関して、Thermo Scientific™ Nunc 96 DeepWell™ プレートおよびABgene™ 96 ディープウェルプレートはA社DNA低吸着プレートと同等の性能を示しました。
- NuncおよびABgeneポリプロピレン製マイクロプレートは、DNA低吸着であることが必要とされるワークフローで有効なソリューションとなります。

はじめに

DNA、RNAおよびタンパク質などのサンプル調製や保存に使用されるチューブやマイクロプレート（以下、プレート）などの主なプラスチック製品は、ポリプロピレン製です。ポリプロピレンは親水性のDNA分子をはじく疎水性ポリマーです。しかし、一部の研究では、核酸やタンパク質がポリプロピレン表面に吸着することが報告されています^[1]。DNAがポリプロピレン製のチューブやプレートに吸着すると、法医学や臨床などの現場で扱われる微量サンプル中のDNAがさらに減少してしまう可能性があります。この減少によりDNAの定量的な検出や解析精度に悪影響を与える可能性があります。したがって、標的遺伝子の増幅が十分に行えず、ジェノタイピングデータが全く得られなかったり、得られても部分的にしか得られない場合があります。

この問題を解決するため、一部のメーカーはチューブやプレートの製造用ポリプロピレンに添加物、または改良を加えることでDNAの吸着を低減させた製品を提供しています^[2]。



Nunc 96 DeepWellプレート (PP)
(製品番号 278743)

チューブやプレートへのDNAの吸着が低いことは、DNAの吸着を懸念する研究者にとって望ましい特長です。しかし、DNA低吸着のプラスチック製品を、DNA結合特性に基づいて分類する国際的な基準は存在しません。そのため、研究者やメーカーはDNA低吸着製品と他の製品のDNA吸着性について客観的に評価することができません。

当社は、DNAサンプルの調製や保存に適したDNA低吸着のポリプロピレン製プレートを提供するため、研究・開発に積極的に取り組んできました。本テクニカルノートでは、まずNuncおよびABgeneのポリプロピレン製プレートの製造に適したDNAの吸着が低いポリプロピレン樹脂を選定するために実施した予備検討をご紹介します。次に、NuncおよびABgeneプレートと他社のDNA低吸着プレートへのDNAの吸着を評価するために実施したリアルタイムPCRを用いた検証をご紹介します。

DNA吸着が低いポリプロピレン樹脂の選択

DNAサンプルの調製や保存には、他の樹脂と比べてDNAの吸着が低いという特性からポリプロピレン製のプレートを使うことが推奨されています^[3]。そこで、プレートの製造用にDNAの吸着が低いポリプロピレンを特定するため、複数のポリプロピレン樹脂から製造されたプレートを用いてDNA吸着を評価する予備検討を実施しました。

本検討には、当社および他社製の11種類のプレートを使用しました。それぞれ異なるポリプロピレン樹脂で製造されており、DNA低吸着プレートとして販売されている製品も含まれます。まず、各プレートへのDNAの吸着を³²P標識DNAを用いて検証しました。テストサンプルは、ウェルの表面形状と体積の違いを避けるために、各プレートからダイカット（抜き型を使って打ち抜く）し、テストサンプルの片面のみ³²P標識ラムダDNA（4.5 ng）を含むDNA溶液50 μ Lに浸しました。20 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした後、Tris-EDTA（TE）緩衝液で洗浄し、テストサンプル上に残った放射能を測定しました。測定結果を図1に示します。

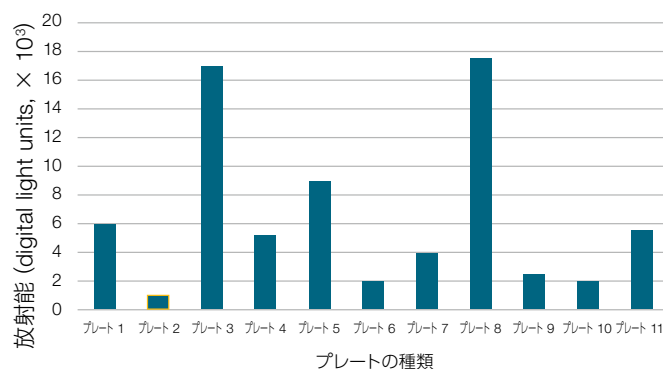


図1. 放射能で測定したプレートへのDNA吸着の比較 放射能が低いほどDNAの吸着が低いことを示します。プレート2（黄色の枠線）が一番DNAの吸着量が少なく最も優れた性能を示しました。

次に、イオン強度によるプレートへのDNAの吸着量を検証するため、イオン強度の高い緩衝液（2.5 M NaCl TE緩衝液）と低い緩衝液（10 mM Tris-HClおよび1 mM EDTA TE緩衝液）を用いてDNAの吸着量を測定しました（図2）。

一般的に、DNAはイオン強度の低い緩衝液中で保存および使用しますが、緩衝液のイオン強度はポリプロピレンへのDNAの吸着に影響を与えることがあり、イオン強度の高い緩衝液によってDNAの吸着が促進されるとわれています。

これらの予備検討において、プレート2のポリプロピレンが最も低いDNA結合特性を示しました。本結果より、当社はプレート2のポリプロピレンをNuncおよびABgeneプレートの開発および製造用の樹脂として選定しました。

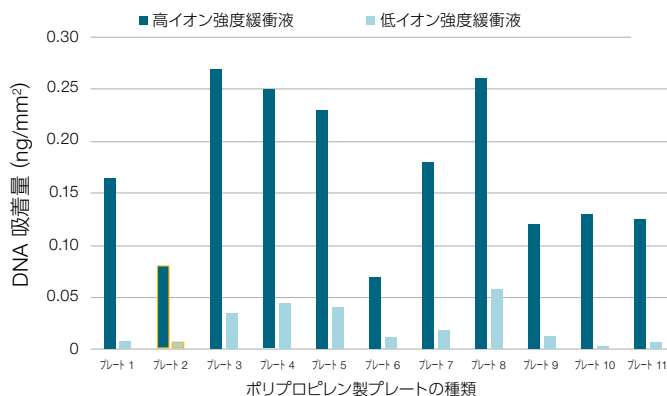


図2. 低イオン強度（TE緩衝液、1 mL EDTAを含む10 mM Tris-HCl）および高イオン強度（TE緩衝液、2.5 M NaCl）条件下におけるプレートへのDNA吸着量の比較 プレート2（黄色の枠線）が両方の緩衝液の条件下でDNAの吸着量が最も少なく優れた性能を示しました。

リアルタイムPCRによるプレートへのDNA吸着の評価

当社は、製品が使われるさまざまなワークフローとアプリケーションを想定してその性能試験を行います。例えば、Thermo Scientific™ DeepWell™プレートは、DNAおよびRNAサンプルの抽出や保存などの分子生物学アプリケーションでよく使われます。

以下の実験では、一般的なqPCRワークフローをシミュレーションしながら、NuncおよびABgeneプレートと他社のDNA低吸着プレートへのDNA結合を測定し、DNA結合特性を比較しました。

材料と方法

検証用のプレートとして、Nunc 96 DeepWellプレート（製品番号 278743）およびABgene 96ディープウェルプレート（製品番号 AB0661）、DNA低吸着ディープウェルプレート（A社）を使用しました。

Nunc DeepWellプレート（以下、Nuncプレート）は、生物試料やゲノム試料、化合物などの保管、次世代シーケンシング（NGS）用サンプルやプラスミドDNA、タンパク質分析用サンプルやペプチドライブラリーの調製などによく利用されています。一方、ABgene ディープウェルプレート（以下、ABgeneプレート）は、NGS用ライブラリー調製や核酸抽出で高く評価されています。そして、これらプレートの比較対象として、表面コーティングせずにプレート表面へのDNAの吸着を抑え、最大のDNA回収率が得られるとうたったA社のDNA低吸着ディープウェルプレート（以下、A社プレート）を用いました。

それぞれのプレートのDNA吸着の違いを検証するために、リアルタイムPCRを使用しました^[4]。qPCR増幅反応では、吸着によるDNAの減少を、Ct値の差で評価できます。25℃（室温）での短時間および長時間の保存条件をシミュレーションするために、保存後0時間（Negative control）、4時間、24時間、および48時間のサンプルを解析することにした。

テンプレートDNAの段階希釈サンプルの調製は、qPCRによる信頼性の高い正確な定量のための重要なステップです。これにより、正確な増幅効率の結果が得られ、樹脂への吸着によるDNA量の減少をCt値から推定できます^[5]。最初に、100,000コピーから100コピーまでヒトゲノムDNA（gDNA）の10倍希釈系列を作成しました。作成したサンプルを各プレートに200 µLずつ分注し（n=4）、室温でインキュベートしました。次に、Applied Biosystems™ TaqMan™ RNase P Detection Assay（製品番号4316831）を使用して、リアルタイムPCRを実施しました。リアルタイムPCRにはApplied Biosystems™ QuantiStudio™ 5 リアルタイムPCRシステム、384ウェル（製品番号A28140）を使用しました。TaqMan RNase P Detection Assayのパフォーマンス試験では増幅効率が>99%であることが確認されました。この高い増幅効率は、DNAの吸着試験にこのアッセイを選択した最も重要な基準で、アッセイの増幅効率の差によるCt値の変動を排除でき、解析されたCt値の差がプレートへのDNAの吸着によるものであると判断することができます^[6]。全データの平均値はStudentのt検定（ $\alpha = 0.05$ ）を用いた統計分析で比較しました。

結果

Nunc、ABgene、およびA社プレートのgDNAコピー数別の平均Ct値を図3に示します。Ct値はgDNAコピー数ごとに算出した全時点（0、4、24、48時間）の平均値です。全てのgDNAコピー数において、平均Ct値は全て同等でした。gDNAコピー数ごとにCt値のわずかな変動が見られますが、明確な傾向は観察されませんでした。これはNuncおよびABgeneプレートがA社プレートに匹敵する性能をもつことを示唆します。したがって、A社プレートとNuncおよびABgeneプレートとの間には実質的な違いはないといえます。

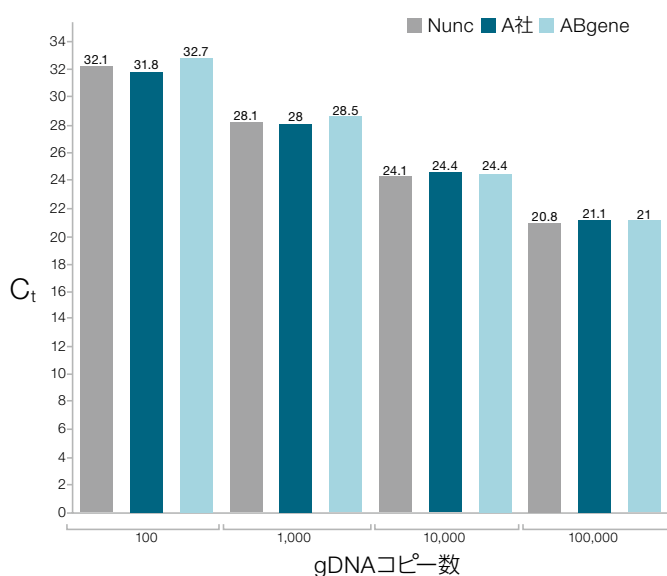


図3. gDNAコピー数別の平均Ct値の比較 Ct値が低いほどDNA回収率が高くなり、プレートへのDNAの吸着が低くなります。

次に、保存時間がプレートへのDNAの吸着に与える影響を評価しました。Nunc、ABgeneおよびA社プレートのgDNAコピー数ごとのCt値を保存時間別に示します（図4）。同じgDNAコピー数では、保存時間が異なってもプレート間のCt値に有意な差は観察されませんでした。また、室温で48時間DNAを保存することによるCt値の変動もほとんどありませんでした。これは、DNAサンプルの保存においても、NuncおよびABgeneプレートはA社プレートに匹敵する性能をもつことを示唆します。したがって、48時間までは室温保存によるNuncおよびABgeneプレートへのDNAの吸着はほとんど無視できると考えられ、DNAサンプルを安定して保存できるといえます。

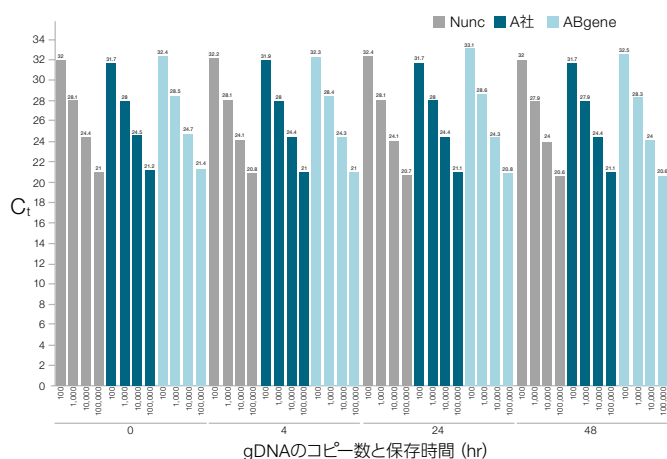


図4. 保存時間別のgDNAコピー数ごとのCt値比較

結論

NuncおよびABgeneポリプロピレン製プレートの製造には、DNAの吸着が低いポリプロピレン樹脂を採用しています。さらに、NuncおよびABgeneポリプロピレン製プレートへのDNAの吸着量は、DNAの低吸着をうたうA社プレートと同等であることを示しました。これは、DNAの吸着性に関して、NuncおよびABgeneプレートがDNA低吸着プレートに匹敵する性能をもつことを示唆します。

本テクニカルノートで示したNuncおよびABgeneプレートのDNA吸着性に関する評価は、PCR、NGSおよびその他のDNA低吸着であることが必要とされるワークフローで有効なソリューションを提供します。



ABgene 96ディープウェルプレート (PP)
(製品番号 AB0661)

参考資料

1. Gaillard C, Strauss F (1998) Avoiding adsorption of DNA to polypropylene tubes and denaturation of short DNA fragments. *Technical Tips Online*. doi:10.1016/S1366-2120(08)70101-6
2. Poncin-Epaillard F, Vrlinic T, Debarnot D, et al. (2012) Surface treatment of polymeric materials controlling the adhesion of biomolecules. *J Funct Biomater*. 3(3):528-543. doi:10.3390/jfb3030528
3. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, et al. (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*. 37(6):e45. doi:10.1093/nar/gkp045
4. Larionov A, Krause A, Miller W (2005) A standard curve based method for relative real-time PCR data processing. *BMC Bioinformatics*. 2005;6:62. doi:10.1186/1471-2105-6-62
5. Wu J, Wang H, Zhu A, Long F (2018) Adsorption kinetics of single-stranded DNA on functional silica surfaces and its influence factors: An evanescent-wave biosensor study. *ACS Omega*. 3(5):5605-5614. doi:10.1021/acsomega.7b02063
6. "Understanding Ct values in real-time PCR." Behind the Bench staff. Thermo Fisher Scientific. Posted October 17, 2022. thermofisher.com/blog/behindthebench/understanding-ct-values

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

研究用におのみ使用できます。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。

© 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.

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 LSP098-A24050B

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

thermofisher.com

thermo scientific