

核酸結合 (NAB) ナノセップ® 遠心デバイスによる PCRやアガロースゲルからのDNA精製

Craig Tamble¹ and Nadia Kadi²

¹Pall Laboratory, Westborough, MA, USA

²Pall Corporation, Portsmouth, UK

背景

ポールの核酸結合 (NAB) ナノセップ遠心デバイスは、二層シリカベースの石英ガラス繊維メディアを採用し、DNAおよびRNAの効率的な結合を可能にし、スムーズな流量と高速処理を実現します。

NAB ナノセップは、様々な出発物質からプラスミド DNA、ゲノム DNA、およびトータル RNA を精製できることを示しています。本書では、NAB ナノセップと市販の試薬キットを使用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) およびアガロースゲルの切片からDNAを精製できることを示しました。NAB ナノセップ遠心デバイスの性能は、PCRの副産物の洗浄またはアガロースゲル抽出のいずれかの市販キットに付属するシリカカラム遠心デバイスと比較しました。

実験で使用した試薬及び方法

PCR産物の精製

New England BioLabs社のOneTaq Quick-Load 2X Master Mixを使用して、市販のプラスミドから1.7キロベースのPCR産物を精製しました。使用する各遠心デバイスが同一のロード条件で試験されるように、複数の反応が実行され、プールされました。PCR産物を洗浄する手順は、PCR洗浄キットのプロトコルに従いました。NABナノセップのリザーバー容量が500 µLであるため、ポールと市販キットの遠心デバイスの容量はいずれも500 µLに統一しました。

アガロースゲルの洗浄

最初に市販のプラスミドを制限酵素消化で直鎖状にしました。1%アガロースゲルの各ウェルに0.6 µgの直鎖状DNAを添加しました。アガロースゲルを分離後、ゲルからバンドを切り出し、製造元のプロトコルに従って処理を行ないました。容量は前回と同様に500 µLに調整しました。

DNAの定量

DNAの定量と純度は、それぞれThermo Fisher Scientific社のQubit FluorometerとNanoDropを用いて測定しました。DNAの純度は、 $A_{260/280}$ と $A_{260/230}$ で決定しました。 $A_{260/280}$ と $A_{260/300}$ は、それぞれ1.7-2.0、2.0-2.2の範囲で純度が高いとみなしました。

結果と考察

PCR産物の精製：市販のPCR洗浄キットを利用して、NABナノセップとシリカカラムの性能比較

ポールのNAB ナノセップと市販のシリカカラム遠心デバイスを用いて、標準的な容量である50 µLの反応からPCR産物を回収できるかどうかを評価しました。その後、回収した全DNAと洗浄後のDNAの純度を比較しました。Table 1に示したように、NAB ナノセップ遠心デバイスは、市販キットのシリカカラム遠心デバイスよりもこのPCR産物から高いDNA回収率を示しました。どちらの遠心デバイスも許容できる再現性と純度を示しました。試験した個々のチューブから得られた DNA 定量化結果は、Fig. 1 に示しました。

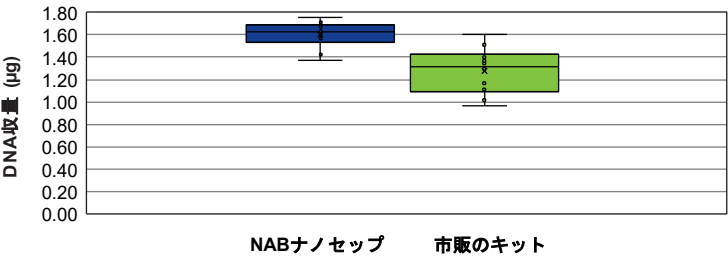
Table 1

NAB ナノセップと市販キットのシリカカラム遠心デバイスを用いてPCR産物を回収し、洗浄後のDNAの収量と純度を比較しました。データはポールNABナノセップ10台と市販キットのスピンドデバイス10台の平均±標準偏差 (SD) を示しました。

	PCR洗浄によるDNA	
	NABナノセップ遠心デバイス	市販のカラム遠心デバイス
収量 (μg)	1.60 ± 0.12	1.28 ± 0.21
A _{260/280}	1.76 ± 0.05	1.77 ± 0.02
A _{260/230}	2.22 ± 0.11	2.18 ± 0.09

Figure 1

PCR産物の回収と洗浄に使用したサンプルのDNA回収量を示しました。PCR産物の回収には、市販の試薬を用いてポールNABナノセップと市販のシリカカラム遠心デバイスで洗浄を行ないました。データはポールNABナノセップと市販のキット装置の両方のn=10の平均値±標準偏差を示しました。



ポールNABナノセップと市販のアガロースゲル洗浄キットのシリカカラムの比較

ポールNABナノセップおよび市販のシリカカラムを使用して、アガロースゲルの洗浄、回収、純度の評価を行ないました。回収した全DNAとDNAの純度は、洗浄後に比較しました。Table 2に示したように、ポールNABナノセップ遠心デバイスは、市販キットのシリカカラムと同様にアガロースゲル切片から全体的にDNAを回収し、どちらもデバイスにおいてもA_{260/280} に関して高い値を示しました。各デバイスのゲル切片の分析から得られた結果はFig. 2に示しました。

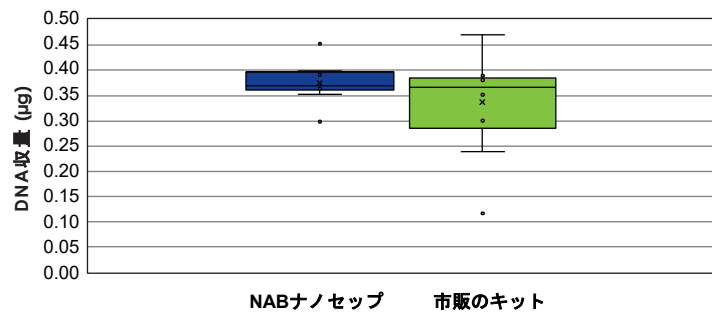
Table 2

ポールNABナノセップと市販キットのシリカカラムを用いたアガロースゲル洗浄後に得られたDNAの収量と純度を示しました。データはポールNABナノセップ10台と市販キットのスピンドデバイス10台の平均±標準偏差 (SD) を示しました。

	アガロースゲル洗浄から得られたDNA	
	NABナノセップ遠心デバイス	市販のシリカカラム
収量 (μg)	0.38 ± 0.04	0.34 ± 1.0
A _{260/280}	1.81 ± 0.14	1.92 ± 0.12

Figure 2

アガロースゲル洗浄に使用したサンプルのDNA回収量を示しました。個別に採取したアガロースゲル切片を市販の試薬を用いて、ポールNABナノセップと市販のシリカカラム遠心デバイスのいずれかを利用し処理を行いました。データはポールNABナノセップと市販のキット装置の両方の $n=10$ の平均値±標準偏差を示しました。



まとめ

PCRやアガロースゲルの洗浄のために、市販の試薬を用いてポールNABナノセップ遠心デバイスを用いて市販の付属のシリカカラムと比較・評価を実施しました。実験結果から、市販キットのシリカカラムと比較して、ポールNABナノセップ遠心デバイスが収量及び純度ともに高い値を示しました。PCR産物及びアガロースゲル切片の試験条件において、ポールNABナノセップは、標準偏差のばらつきが小さいことから、市販のキットのシリカカラムよりも再現性と精度が高いことが示されました。