

Application News

マイクロチップ電気泳動装置MultiNA™

マイクロチップ電気泳動を用いた エンドポイントPCRのさらなる高速化

曾我部 有司

ユーザーベネフィット

- ◆ 迅速にエンドポイントPCRを行うことができます。
- ◆ 電気泳動の操作は全自動であるため準備から検出まで大幅に省力化できます。
- ◆ アガロースゲル電気泳動・エチジウムブロマイド検出よりも高感度であるため少量のPCR産物でも検出できます。

はじめに

従来、PCRと言えば、DNAの増幅の完了（エンドポイント）を電気泳動などで確認するPCRのことを指していました。定量的なリアルタイムPCRと対照的にエンドポイントPCRは定性的ですが、対象サンプル中に特定DNAの有無、病原性原因遺伝子の検出など様々な場面で使用されています。

一般的なエンドポイントPCRのサイクル数は20から30サイクルくらいで反応終了までにおよそ1時間から2時間を要します。さらにアガロースゲル電気泳動はゲルの作成から結果を得られるまでにおよそ3時間以上を要します。

プロメガ社のGoTaq Rapid PCR Master Mixは酵素、dNTPおよびバッファー類がすでに混合されているマスターミックスなので鋳型DNAとオリゴヌクレオチドプライマーを添加するだけでPCR反応液が調製できます。一方、エッペンドルフ社のMastercycler X50s Thermal cyclerはおよそ10°C/sec加熱速度とおよそ5°C/sec冷却速度が可能であり両者の組み合わせでおよそ15分でエンドポイントPCRを実行することができます（増幅サイズや機器に依存）。マイクロチップ電気泳動装置はアガロースゲル電気泳動と同等の分析を全自動で実行できる分析装置です。ゲルを作成する必要がなく、専用の試薬キットと分析サンプルを装置にセットするだけで分析を行うことができます。

本稿ではプロメガ社のGoTaq Rapid PCR Master Mixとエッペンドルフ社のMastercycler X50s Thermal cyclerを用いて増幅したPCR産物を調製し、島津製作所のマイクロチップ電気泳動装置MCE-202 MultiNAで分析した高速エンドポイントPCRについて紹介します。

■ 試料と分析条件

試料の調製

PCRの鋳型としては50 ngのHuman genomic DNAを用いました。PCRの増幅ターゲットはHuman Beta-2-microglobinとしました。PCRの試薬にはプロメガ社のGoTaq Rapid PCR Master Mix (図1 A) を用いました。反応液の調製は添付のプロトコルに従いました。PCR反応にはエッペンドルフ社のMastercycler X50s Thermal cycler(図1 B)を用いました。PCRのCycling settingは表1に示します。PCR反応はn=3で実施しました。

表1 Cycling setting

Description	Cycles	Time	Temperature
Activation	1	1 min	94°C
Denaturation	35	2 sec	95°C
Annealing/Extension		6 sec	65°C
Elongation	1	1 min	72°C

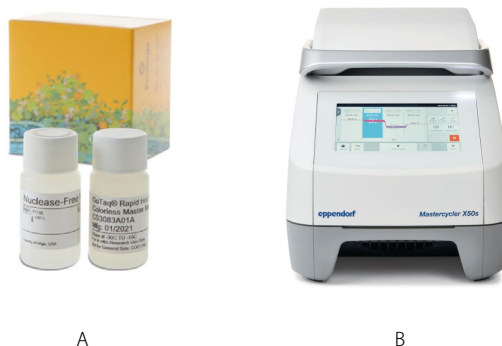


図1 A: GoTaq Rapid PCR Master Mix (プロメガ社)
B: Mastercycler X50s (エッペンドルフ社)

MultiNAによるPCR産物の測定

PCR産物をマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA(図2)で分析しました。分析は蛍光色素にSYBR Gold、MultiNA専用の試薬キットはDNA-1000キットを用いました(表2)。

表2 PCR産物の分析条件

System	: MCE202 MultiNA
分析モード	: DNA-1000 Onchip
キット	: DNA-1000kit (島津製作所)
蛍光色素	: SYBR Gold (Thermo Scientific)
ラダー	: 100bp DNA Ladder (タカラバイオ)



図2 マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA™ (島津製作所)

■ 分析結果

Human genomic DNAからターゲットとしたHuman Beta-2-microglobulinの領域をマイクロチップ電気泳動にて、200 bp、600 bp、1000 bpおよび最大 1400 bp までの増幅を確認することができました(図3)。200 bp、600 bp、1000 bpについて、明瞭に増幅DNAが確認できました。1400 bpの増幅産物が他と比べて少なく検出されましたが、おそらくPCRの増幅効率が低かったと予測されます。MultiNAは蛍光検出のためアガロースゲル電気泳動+エチジウムブロマイド染色の検出と比較して、およそ一桁高感度に検出することができます。そのため今回は1400 bpの増幅産物を検出することができました。

■ まとめ

一般的なエンドポイントPCRでの反応時間はおよそ1時間から2時間を要します。今回、PCRの反応試薬にプロメガ社のGoTaq Rapid PCR Master Mix、サーマルサイクラーにはエッペンドルフ社のMastercycler X50sを用いてエンドポイントPCRを実施したことにより、PCRの反応時間がわずか13分30秒で完了することができました。さらにこのPCR産物はゲルを作成することなく、マイクロチップ電気泳動装置MultiNAで全自動分析を行いました。MultiNAはサンプル数の多少にかかわらず、試薬の調製からサンプルのセット等の分析前準備をおよそ10分から15分で完了し、電気泳動を開始することができます。また、分析時間については、例えば8サンプルではおよそ40分、96サンプルではおよそ180分*で分析を完了することができます。分析開始後、ユーザは結果が出るのを待つだけです。

GoTaq Rapid PCR Master Mix、Mastercycler X50s、MultiNAを組み合わせることによりエンドポイントPCRに要する時間の短縮や省力化に大きく貢献することができます。

* マイクロチップを4枚使用、DNA-1000キットを用いてオンチップモードで分析を行った場合。

<参考文献>

Breaking Barriers: Endpoint PCR in 15 Minutes or Less.
APPLICATION NOTE No. 446
Arora Phang YL, Andrew Taft, Leta Steffen, Adam Waite,
Eppendorf AG, Hamburg, Germany; Promega, Madison,
Wisconsin

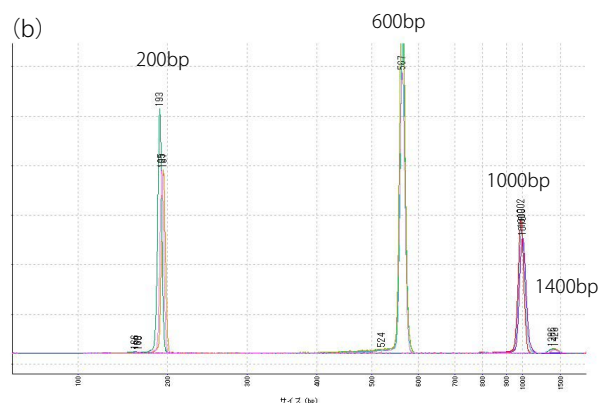
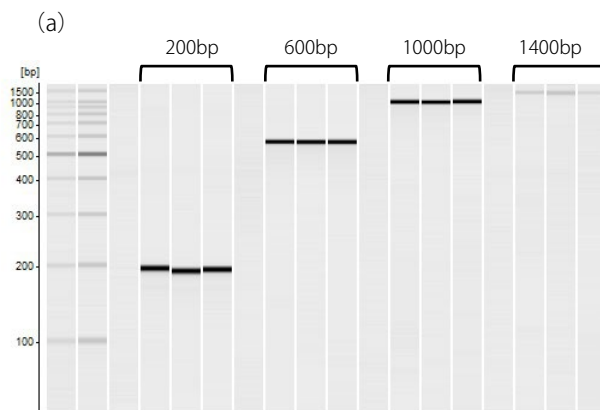


図3 MultiNAによる分析結果 (n=3)
(a: ゲルイメージ、b: エレクトロフェログラム)

このアプリケーションニュースは株式会社プロメガとエッペンドルフ株式会社との協業によるものです。



プロメガ株式会社



エッペンドルフ株式会社



MultiNAは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

01-00631-JP 初版発行：2023年 9月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
本文中では「TM」、「®」を明記していません。

▶ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



関連分野

▶ ライフサイエンス

▶ ゲノミクス

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ