

EluNA™を用いた芽胞からのDNA抽出と プラスミドを用いた回収率評価

井星 大雅^{1,2}、曾我部 有司¹、平松 崇英^{1,2}、佐藤 充治³

¹ 島津製作所、² Shimadzu (Asia Pacific)、³ Veredus Laboratories Pte. Ltd.

ユーザーベネフィット

- ◆ 抽出作業の自動化により短時間で容易にDNAを抽出できます。
- ◆ DNA抽出工程は閉鎖系であるため、試料の暴露リスクを最小限に抑えることができます。
- ◆ 芽胞から効率的にDNA抽出ができます。

■はじめに

遺伝子解析は医学、法科学、農業など、多岐にわたる分野で行われています。感染症分野においては、病原体由来のDNAまたはRNAを特異的に検出することで感染した病原体を特定できます。法科学の分野では、生体由来の試料（血液や毛髪など）から検出されたDNA情報が犯人特定の証拠として利用されます。また、農業の分野では、農作物や家畜から有用な個体を選別する目的等で遺伝子解析が行われます。このような遺伝子解析を行う場合、通常は前処理として、生体組織などの試料から核酸(DNAやRNA)を抽出する必要があります。

核酸抽出システムEluNAは、装置本体と専用の試薬キット（磁気ビーズ入り細胞溶解液と抽出カラム）で構成されています（図1）。本システムを用いることで、約2分の前処理操作のみで、試料からのDNA抽出が自動で行われます。また、DNAの抽出工程は1本のカラムの中で完結するため、感染性の疑いのある試料を取り扱う場合でも作業への暴露の危険性を低減することができます。

本アプリケーションでは、核酸抽出システムEluNAと全血用試薬キットを芽胞からのDNA抽出に適用し、プラスミドを用いて回収率を評価した事例を紹介します。

■DNA抽出における課題

試料からPCR法によって特定遺伝子の検出を行う場合、はじめに試料から核酸抽出を行います。核酸抽出には各種抽出試薬キットが各種販売されていますが、そのほとんどは比較的長時間の手作業を必要とする製品です。この場合、良質な抽出結果を再現性良く得るため、また、限られた量の試料から高効率で核酸を得るためには、高度な習熟が必要となります。EluNAはDNAの抽出操作をほぼ全自動で実施できるため、簡便で再現性の良いDNAの抽出結果を得ることができます。

■EluNAによるDNA抽出

EluNAによるDNA抽出は専用の試薬キットを使用します。試料投入後、キャップとアルミシールによって閉鎖されたカラム内でDNA抽出が実施されます（図2）。そのため、試料による汚染リスクも少なく非常に安全にDNA抽出が可能です。

試料が投入された後、試料中の細胞は溶解液によって破壊され、遊離したDNAは磁気ビーズと結合します。その後、装置に付随する磁石の移動に伴い、洗浄と溶出が自動で行われ、最終的に抽出されたDNAを得ることが出来ます。

カラム内には脂質やタンパク質を除去するために2種類の洗浄液が含まれています。洗浄液と洗浄液の間にはゲルが介在し、液層を分離させています。磁気ビーズとそれに付着したDNAのみが層を横断でき、効率の高い抽出を可能にしています。

大型の自動機を用いたDNA抽出の場合、自動機の中では試料は開放系で取り扱われることが多く、試料の飛散やコンタミネーションの懸念があります。本装置は使用する試薬をカラムに封入しているため飛散の危険性はありません。また使用した廃液はカラム内に保持されるため、廃棄時の安全性が高く、クリーニングや廃棄にかかる時間も削減できます。



図1 EluNA™ (左) および EluNA Whole Blood DNA Kit (右)



図2 EluNAのDNA抽出工程

■ 検討内容

今回、全血以外の試料への適用を示すために、芽胞とコントロール用プラスミドを対象とし、定量PCR法を用いてEluNAのDNA抽出性能を評価しました。DNA抽出とPCR分析それぞれの検討に関して、EluNAとA社核酸抽出装置を用いて前処理しました(表1)。

芽胞については抽出と残存量を評価し、合わせてプラスミドを用いて回収率の評価を行いました。芽胞は、一般的にタンパク質とペプチドグリカンで構成される複数の層に表面が覆われており、このような構造が芽胞のDNA抽出効率を下げる原因になっています。つまり芽胞の残存量が少なければ純度の高いDNA抽出が可能であると言えます。

表1 使用装置

DNA抽出	島津製作所	A社
製品名	EluNA	-
抽出方法	磁気ビーズ	磁気ビーズ
処理能力	2本/run	1~24本/run
試料量	300 μ L	50~1000 μ L
Run time	10分以内	最短約40分

PCR分析	
使用装置	CFX 96 Touch (BioRad社)
蛍光ラベル	FAM (芽胞ゲノム)、HEX (プラスミド)

■ DNA抽出の評価

8 \times 10⁴個の芽胞と10⁵コピーのコントロール用プラスミドを300 μ LのPBSに添加し、EluNAを用いてDNA抽出を行いました。得られた抽出液についてPCR法を用いてDNA抽出の評価を行いました。検出には芽胞のゲノム内遺伝子と、プラスミド上のインサート配列に対するプライマー・プローブを使用しました。PCRの結果から、EluNAを用いることで芽胞からのDNA抽出が可能になりました。

またPCRの結果から、A社抽出装置と比較して、芽胞では1 Cq以上、プラスミドでは3 Cq以上早いベースラインの立ち上がりを確認しました(図3)。一般的にPCR中の遺伝子のコピー数が多い場合に、Cqは低い値となるため、A社抽出装置と比較してEluNAのDNA抽出効率が高いことが示唆されました。

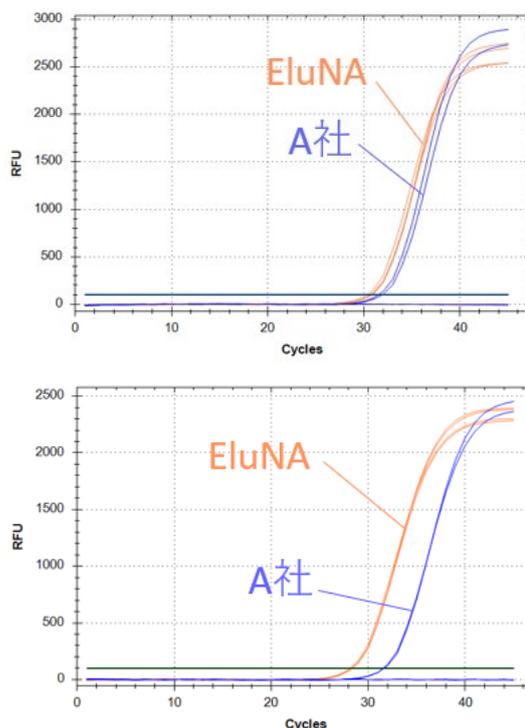


図3 抽出液に関するPCRでの検出結果
(上) 芽胞遺伝子 (FAM)、 (下) プラスミド配列 (HEX)

■ プラスミドDNAの回収率評価

回収率の評価のために既知濃度のコントロールプラスミド試料を用いて検量線を作成し、抽出液におけるプラスミドの回収率を求めました。

105コピーのプラスミド試料を、EluNA、A社抽出装置それぞれから得たブランク抽出液で段階希釈して10¹から10⁴コピーの濃度に調製しました。同時に10⁵コピーのプラスミドを300 μLのPBSに添加し、DNA回収を行いました。PCR法により得られたCq値から検量線を作成し、抽出液中に含まれるコピー数を算出し、回収率を評価しました（図5、表2）。この評価系において、EluNAは回収率が13%以上であったのに対してA社は1%であり、EluNAを用いた抽出は、A社抽出装置と比較して高い回収率であることが分かりました。

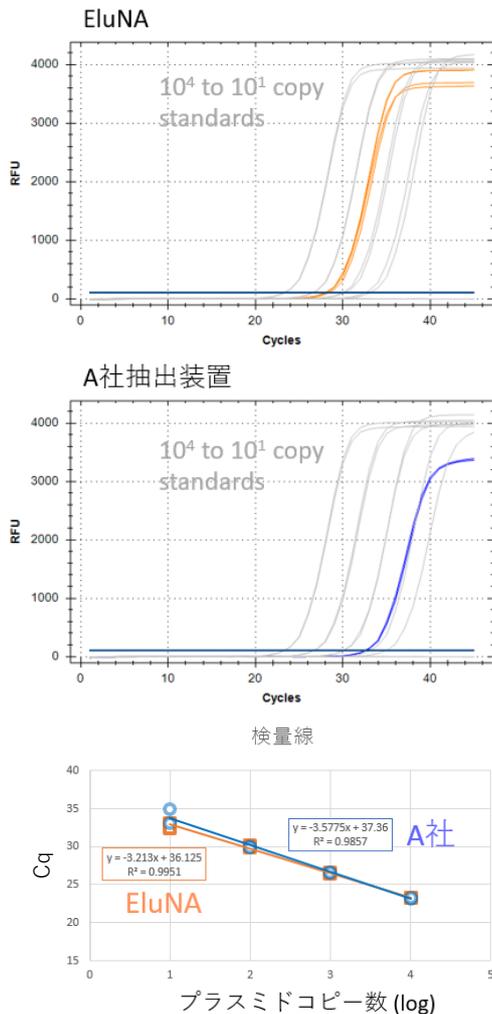


図4 プラスミドDNAの回収率評価のためのデータ

表2 回収率の評価

	The Total copy recovered in eluate	% of 10 ⁵ recovery rate
EluNA	13,222	13.2
A社	937	0.9

EluNA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。

■ 抽出液中の芽胞残存量の評価

EluNAとA社核酸抽出装置を用いて得られたDNA抽出液の一部を採取し培養することで、DNA抽出液中の芽胞の残存量を評価しました（図6）。結果として、A社抽出装置から得られた抽出液からは18コロニーが形成されましたが、EluNAから得られた抽出液からは1コロニーのみが形成されました。これにより、EluNAによる芽胞からのDNA抽出では、DNA溶出液における芽胞の残存がきわめて少ないことが確認できました。

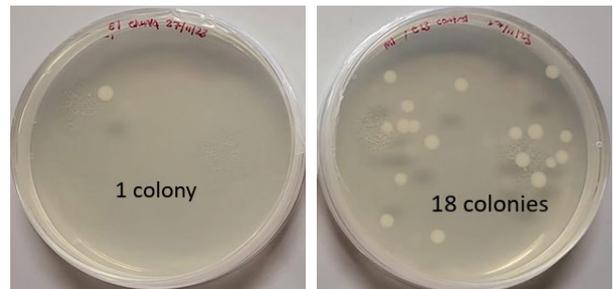


図5 抽出液における芽胞の残存量の評価
左：EluNAを用いた抽出液の培養結果、
右：A社核酸抽出装置を用いた抽出液の培養結果

■ まとめ

EluNAと全血用試薬キットを用いた血液試料以外の適応例として、芽胞からDNA抽出とプラスミドから回収率を評価しました。

EluNAによるDNA抽出では、一般的な細胞と比較してDNA抽出が困難とされる芽胞においてもDNAを抽出することができました。

また、プラスミドを用いた評価において、EluNAはA社抽出装置よりも高い回収率でDNAを得ることができました。

今回は試薬キットとしてEluNA Whole Blood DNA kitを用いました。このキットを用いることで、全血試料のみならず芽胞およびプラスミドを試料とした場合においても、高効率でのDNA抽出が可能であることがわかりました。

<謝辞>

本アプリケーションの作成にあたり、Veredus Laboratories Pte. Ltd. 佐藤 充治様には、多大なるご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。