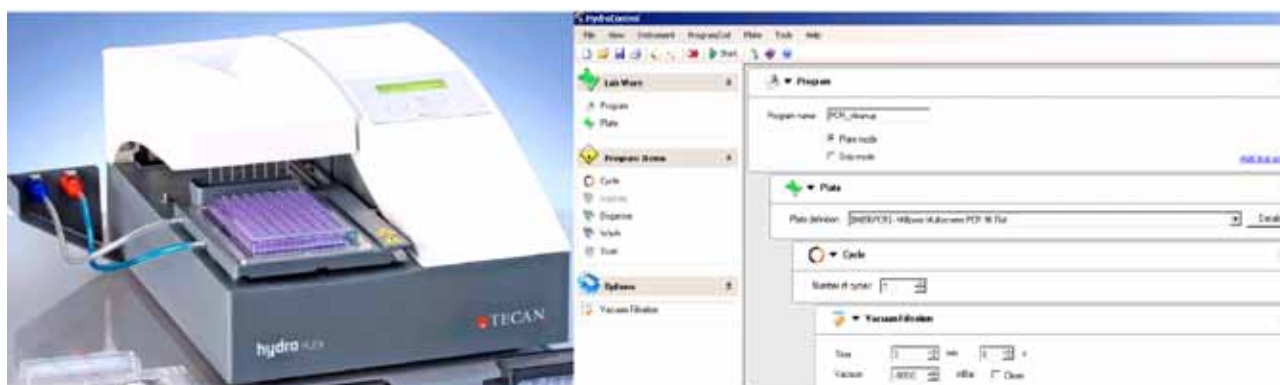


## 生産性向上のための PCR 産物精製における自動化

### オプション “バキュームフィルトレーション機能” HydroFlex™



#### はじめに

生体分子の精製には、汚染物質の除去、脱塩、バッファー交換、サンプル濃縮からなる一連の操作が必要である。

精製用自動バキュームフィルトレーション技術は、多数のサンプルを同時に処理することができ、処理速度やコンシステンシーが高いほか、対象生体分子の生物活性を保持することができるなど、利点が多い。

シーケンシング、ハイブリダイゼーションなど、さまざまなものに利用するためには、PCR 増幅 DNA を精製して、プライマーやその他の成分を反応混合液から除去する必要がある。バキュームフィルトレーションプロトコルの生産性を上げるため、HydroFlex は、フィルトレーションプレートのセルフシーリング、オンラインバキュームコントロール、洗浄バッファーの高速分注を始めとする数々の主要なステップを自動化している。

さらに、HydroFlex は、バキュームレンジを -50 mbar から -850 mbar まで調節可能であり、高真空を用いる自動 PCR クリーンアップや、低真空を用いるピーズアッセイにうつてつけである。

また、HydroFlex は、バキュームレベルのオンラインコントロールが可能であり、フィルトレーションを素早く開始、停止させることができる。これにより、手作業のプレキャリブレーションが過去のものになった。

本稿では、オプションのバキュームフィルトレーションを備えたモジュラープラットフォームである Tecan HydroFlex を用いた自動バキュームフィルトレーションによる PCR 産物精製について報告する。

#### 材料と方法

##### 機器

- 8 連マニフォールドおよびオプションのバキュームフィルトレーションを備えた HydroFlex プラットフォーム (Tecan Austria、オーストリア)
- マイクロプレートシェーカー
- Infinite™ M200 (Tecan Austria)

##### 材料

- 1000 bp PCR 産物 (ザルツブルグ大学、オーストリア)
- 96 ウェルフィルトレーションプレート Montage® PCRμ96 LSKM PCR10 (Millipore、マサチューセッツ州)
- ヌクレアーゼフリー水 (Carl Roth GmbH、カールスルーエ)
- SYBR® Green (10000 × 保存溶液)、FMC Bio Products、メイン州、アメリカ)

## 方法

バキュームフィルトレーション後の DNA 回収量を蛍光強度測定によって定量するため、増幅 PCR 産物 4.2 ml およびヌクレアーゼフリー水 16.8 ml と、0.42  $\mu$ l SYBR Green とを混合した。

PCR 操作による増幅 DNA を精製するため、PCR 産物混合液 100  $\mu$ l/ウェルを 96 ウェルフィルトレーションプレートに分注した。

フィルトレーションプレートを HydroFlex バキュームフィルトレーション装置にセットし、下記の自動バキュームフィルトレーションプロトコルを起動した。

フィルターボトムプレートに吸引圧-800 mbar を 3 分間かけて、濾過膜上の増幅 DNA を回収し、不要な成分を濾液とともに除去する。

アッセイに応じて、HydroFlex は、増幅 DNA をさらに入念に「洗浄」するため、バキュームフィルトレーションと分注を繰り返すプロトコルを自動で実施することができる。

DNA を回収するには、まずプレートを HydroFlex バキュームフィルトレーション装置からはずし、50  $\mu$ l のヌクレアーゼフリー TE バッファーまたはヌクレアーゼフリー水を各ウェルに加えて濾過膜表面を覆う。次に、フィルトレーションプレートを MTP シェーカーで 1100 rpm、10 分間アジテーションして、精製 DNA を再懸濁した。

再懸濁し、標識した DNA を含む上清を 96 ウェル平底型プレートに移し、Tecan Infinite M200 リーダーを用いて蛍光強度を測定した (  $ex$  485 nm/  $em$  535 nm )。

PCR 産物の SYBR Green 蛍光強度を、バキュームフィルトレーションの前後に測定して、回収率を求めた。

## 結果と考察

HydroFlex 自動バキュームフィルトレーション装置および MultiScreen PCR<sub>96</sub> フィルトレーションプレートを用いて、PCR 操作による増幅 DNA サンプル合計 96 を精製した。

1000 bp の長さの増幅 DNA の精製をめぐって、HydroFlex を用いた自動バキュームフィルトレーションプロトコルにより良好な結果を得ることができ、80%を超える高い回収率を得た ( 図 1 および 2 )。

Tecan HydroFlex プラットフォームを用いて、バキュームフィルトレーションによって得た精製 DNA は、ハイブリダイゼーションやシーケンシングなどにそのまま使用可能である。

Tecan HydroFlex を用いた バキュームフィルトレーション： -800 mbar、3 分間			
回収率	試験 1	81.63%	4.81
	試験 2	80.29%	8.3
生データ [ RFU ]	試験 1	33871.8	1965.5
	試験 2	33315.7	3450.4

図 1： DNA のバキュームフィルトレーションによる回収率 (-800 mbar、3 分間)

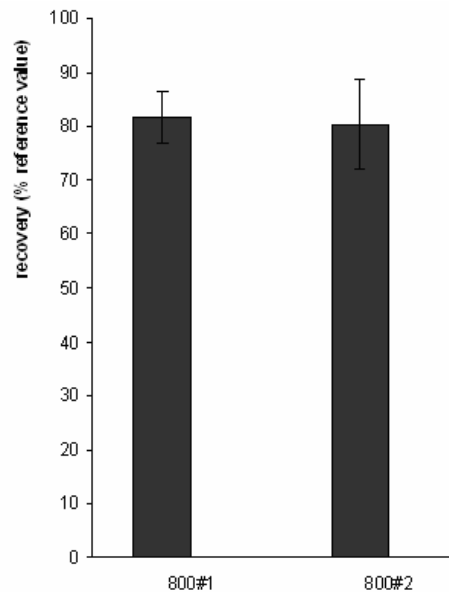


図 2： Tecan HydroFlex プラットフォームを用いたバキュームフィルトレーション (-800 mbar、3 分間) による精製後の SYBR<sup>®</sup>Green 標識 DNA 回収率

## 結論

PCR 操作による増幅 DNA 精製に関して、バキュームフィルトレーションのオプション機能を備えた HydroFlex プラットフォームを用いると、高い回収率と同時に、主要な操作の自動化によって高い生産性が得られる。

HydroFlex プラットフォームを使用することにより、バキュームレベルのプレキャリブレーション、フィルトレーションステップの開始と停止、従来法によるバキュームフィルトレーションをめぐる手作業での分注操作など、プロトコルの面倒なステップが過去のものになった。

Tecan HydroFlex Washer プラットフォームは、バキュームフィルトレーション、マグネティックビーズセパレーション、マイクロプレート洗浄の自動化に応用できるようデザインされた 1 台 3 役のコンパクトな装置である。

このコンパクトな HydroFlex バキュームフィルトレーション装置は、単体でも使用可能であるほか、多量のサンプルを高速処理したい場合には、Tecan ワークステーションと容易に組み合わせることもできる。

## 謝辞

ザルツブルグ大学分子生物学科の Tobias Kiesslich 修士、Juergen Berlanda 修士 (B. Krammer 教授研究グループ) に感謝いたします。

[www.uni-salzburg.at/pdt](http://www.uni-salzburg.at/pdt)

2007 年 5 月

Tecan Group Ltd.は、本稿に正確かつ最新の情報を記載するよう努力していますが、遺漏や誤りがないとは限りません。このため、本稿にある情報の正確性、完全性について、Tecan Group Ltd.は明示的であれ黙示的であれ、一切の言明も保証も致しません。本稿を、随時、予告なく変更することがあります。このなかで言及した商標はいずれも、法律により保護されています。本稿に記載されている仕様の技術的詳細および操作の詳細については、最寄の Tecan 販売店に御連絡ください。本稿は、市場によっては入手できない製品について記載することがあります。最寄の販売店に御確認ください。

©2007, Tecan Trading AG,スイス、著作権所有。

Tecan は、主要諸国で、スイス、Männedorf の Tecan Group Ltd.の登録商標です。

HydroFlex は、スイス、Männedorf の Tecan Group Ltd.の商標です。

SYBR Green は、Molecular Probes Inc.の登録商標です。

Montage は、Millipore Corporation の登録商標です。

**Austria** T +43 62 46 89 33 **Belgium** T +32 15 42 13 19 **China** T +32 15 42 13 19 **Denmark** +45 70 23 44 50  
**France** +33 4 72 76 04 80 **Germany** +49 79 51 94 170 **Italy** +39 02 215 21 28 **Japan** +81 44 556 73 11  
**Netherlands** +31 18 34 48 174 **Portugal** +351 21 000 82 16 **Singapore** +65 644 41 886 **Spain** +34 93 490 01 74  
**Sweden** +46 31 75 44 000 **Switzerland** +41 44 922 89 22 **UK** +44 118 9300 300 **USA** +1 919 361 5200  
**ROW** +43 62 46 89 33