



プラスミドDNA精製用 Lysate Direct PhyTip® カラム

Performance Features:

- 溶解物の濾過や遠心分離は不要
- 最大15µgまで精製
- トランスフェクション・レディ、シークエンシング・レディ
- 一度に96サンプル、及び12回を処理できます
- 下流のアッセイに適しています
- 迅速かつ完全に自動化された、使いやすいシステム

Introduction

ライフサイエンス研究者のイノベーションのペースは、利用可能なツールの限界を絶えず加速しています。ハイスループット構築物配列決定スクリーニング、結晶学およびDNAなどの技術は進歩していますが、プラスミドDNAミニプレップを実施するための技術は依然、変わっていません。同時に、フィルタープレートや磁気ビーズのような伝統的なプラスミドDNA精製フォーマットをより高い処理能力に合わせるため、自動液体ハンドリングシステムを利用することに、より大きな重点が置かれています。しかし、その効果は限られています。これらのアプローチに対する主な課題は、溶解したサンプルの複雑さにあります。現行の方法はDNA結合工程の前に、遠心分離または真空濾過および「注意深い移動」によって、細菌細胞溶解物から沈殿物および残屑を除去することを必要とする(Fig. 1)。遠心分離は自動化が難しく、人間の介入を必要とします。濾過法および移送法では、しばしばピペットチップの詰まり、

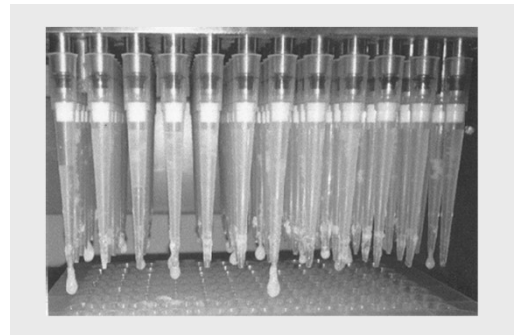


Figure 1: 自動化ミニプレップの問題: メーカーの手順に従って、96ウェルプレートミニプレップを、再懸濁、細胞溶解および中和工程から、実施します。上清を含有するプラスミドを磁気ビーズまたは真空フィルタープレートに移すために液体ハンドリングオートメーションを使用したその後の試みは、ピペットチップの詰まり、一貫性のない流体の移動および沈殿物の移動をもたらしました。

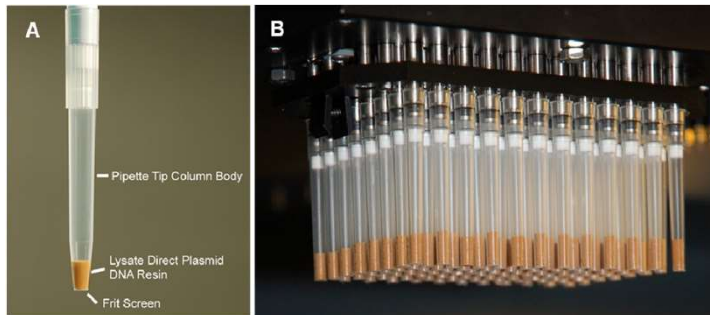


Figure 2: プラスミドDNA精製用Lysate Direct PhyTip®カラム

フィルターへの沈殿物の移送、不均一な流体の流れ、およびサンプル間の交差汚染が生じます。高スループットに対するこのような障害は、プラスミドDNAミニプレップを自動化するための現在利用可能な方法を、妨げてきました。

PhyNexusは再現性のある自動プラスミドDNAミニプレップを、真のワークアウェイを得るための解決法を開発しました。Lysate Direct PhyTip® カラム テクノロジーはピペットチップフォーマット

Technical Note

トを精製カラムとして構成しています。これらの新規な精製カラムは、プラスミドDNA結合レジンを含むピペットチップと、レジンを保持するためのチップ末端の薄い不活性フリットスクリーンから構成されています (Fig. 1A)カラムのユニークなデザインは、沈殿物および破片の存在下で、サンプルを除去することなく、細胞溶解物から直接DNA結合を可能にします。遠心分離または濾過の必要性を排除することによって、プラスミドDNA精製のためのLysate Direct PhyTip® カラムは、ハイスループット検査室で見出される液体処理自動化を利用して、最大96サンプルを同時に容易に精製することを可能にします (Fig. 1B)。Lysate Direct PhyTip® カラムは、PhyNexus社製の12回サンプル処理用MEA Personal Purification Systemにも対応しています。

Methods

*E. coli*細胞を遠心分離により回収し、細菌細胞ペレットを再懸濁し、溶解し、標準ピペットチップを用いて混合することにより沈殿させました (Fig. 3)。沈殿工程後、プラスミドDNAを直ちにLysate Direct PhyTip® カラム上に捕集しました。沈殿剤の存在下で樹脂にプラスミドDNAを結合させるために、12サイクルの吸吐ピペティングを実施しました。カラムをそれぞれ2サイクルの吸吐ピペティングを用いて、洗浄緩衝液の3つの別々のアリコートで洗浄しました。カラムを真空マニホールドで風乾しました。最後にプラスミドDNAをPhyTip® カラムから前後に1サイクル流して、溶出しました。

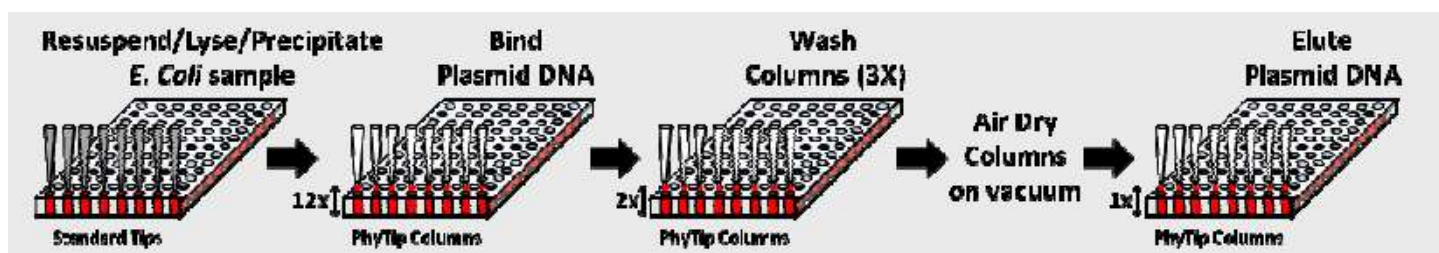
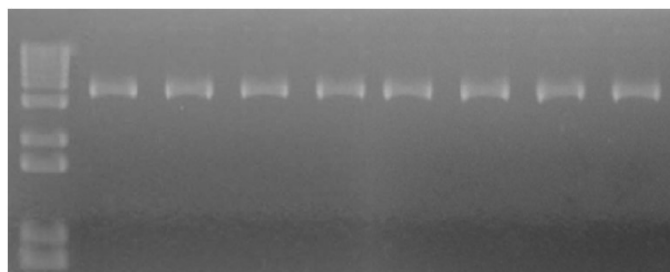


Figure 3: Lysate Direct PhyTip® カラムによるサンプル処理の概略図。処理のために、緩衝液を96ウェルブロックに予め分注します。液体ハンドリング器具は、カラムをポジションからポジションに移動させ、ピペティング機能を実行するために使用します。

Results

Lysate Direct PhyTip® カラムは、一貫した純度と高収率を提供します。

pCR4-TOPO®プラスミドで形質転換した単一の細菌コロニーを8つの培養に接種しました。培養物を37°Cで振盪しながら16時間増殖させました。培養物を上記のように処理し、UV分光法およびアガロースゲル電気泳動により分析した (Fig. 4)。収量は一貫しており、平均19 µgが6% CVで回収されました。DNAをアガロースゲルで可視化し、純度をA₂₆₀/A₂₈₀ およびA₂₆₀/A₂₃₀ 比で測定しましたが、これらは許容範囲内でした。



Sample	Yield	Conc	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1	18.5	201	1.97	2.12
2	19.4	208	1.98	2.02
3	18.5	204	1.95	1.97
4	16.5	188	1.97	2.12
5	17.7	195	1.95	2.00
6	19.1	206	1.94	1.96
7	19.5	206	1.96	1.96

Figure 4: Lysate Direct PhyTip®カラムで精製したプラスミドDNAの分析。Lysate Direct PhyTip® カラムを用いて精製した非線形化プラスミド (pCR4-TOPO) のアガロースゲル分析により、DNAの質を定性的に評価しました。精製したサンプルを2%アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイドで染色しました。Lanes 2-9: 8回の独立した精製から負荷した1 µL。Lane 1: 400 ngの1 Kb Plusラダー。

Results Cont.'d

DNAの品質はDNA配列決定に適しています。

Lysate Direct PhyTip® カラムで精製したプラスミドDNAをGenscriptに送り、ABI 3730xl装置を用いて配列決定しました。600塩基対まで良質な配列データが得られました(Fig. 5)。

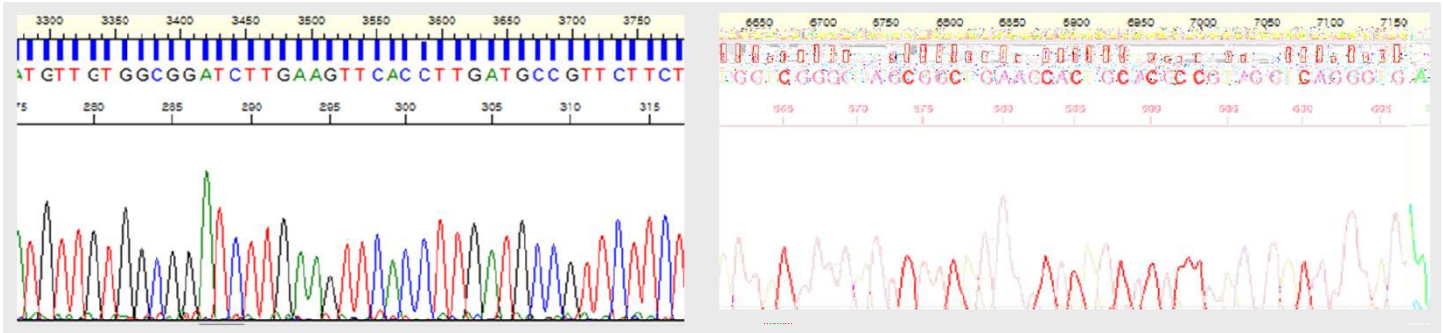


Figure 5: Lysate Direct PhyTip®カラム精製法による配列分析。Lysate Direct PhyTip® カラムで精製したプラスミドDNAをABI 3730xl装置で配列決定しました。Sequence Scanner version1.0ソフトウェアを用いて配列を分析し、QV ≥ 20の塩基754を有する784連続読み取り長を得ました。(Left) 275~336塩基の配列ピークを示します。配列ピークは非常に鋭く、バックグラウンドノイズピークは最小です。(Right)配列のピークは560~606塩基です。ピークは依然として非常に鋭く、バックグラウンドノイズピークはわずかに増加し、配列の読み取りを妨害しません。

精製プラスミドDNAの品質はトランスフェクショングレードです。

GFPをコードするプラスミドDNAをLysate Direct PhyTip® カラムを用いて精製し、次いでトランスフェクション効率について試験しました。精製したプラスミドの品質は、3つの異なるトランスフェクション試薬を用いたCOS7細胞へのトランスフェクションによって示されました(Fig. 6)。さらに、得られたGFPの発現を用いて、DNA品質アッセイを実施しました。

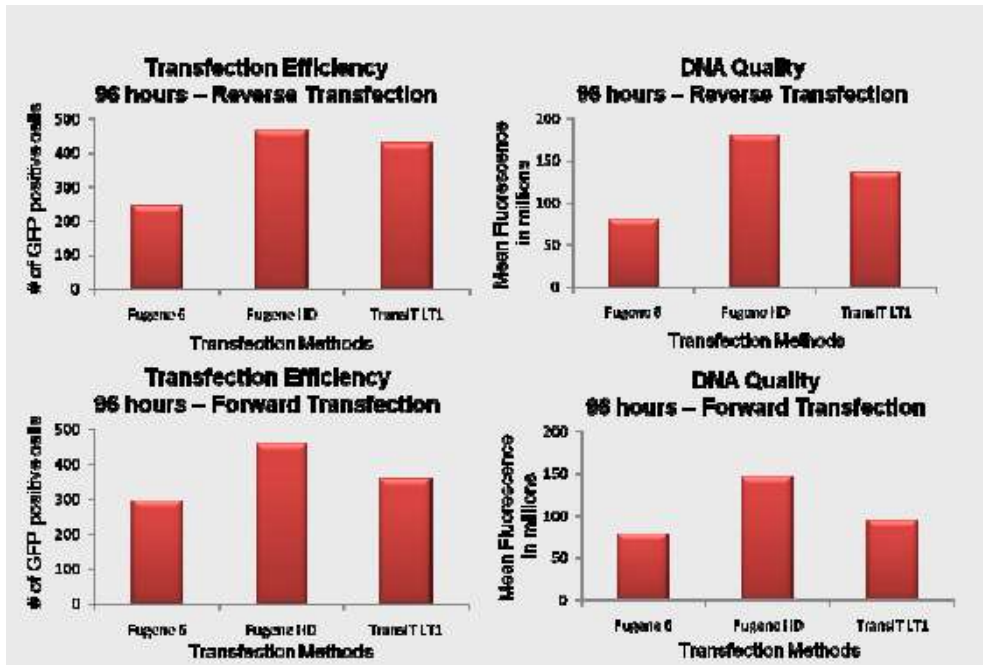


Figure 6: Lysate Direct PhyTip® カラム精製法からのDNAのトランスフェクション効率分析。50 ngのプラスミドDNAを、3つの異なるトランスフェクション試薬(Fugene 6, Fugene HD、および TransIT LT1)を用いてCOS7細胞にトランスフェクションしました。トランスフェクションはメーカーの提案したプロトコールに従って行いました。トランスフェクションの96時間後、GFP陽性細胞を計数し、Incu Cyte装置を用いて各方法について平均蛍光を計算しました。

**Data courtesy of K. Billeci and T. Di Iorio Salvador, Genentech.

Conclusion

現在利用可能な自動化プラスミドDNA精製のシステムは、細菌細胞の溶解および中和後に存在する複合体サンプルの除去に伴う固有の問題があり、信頼性、再現性に課題があります。自動化された方法は精製前に上清から細胞片、沈殿したタンパク質、およびゲノムDNAを除去することに依存しています。

Conclusion, cont'd

しかし、これらの微粒子は遠心分離工程なしでは効果的に除去することができず、したがって手動の介入を必要とします。遠心分離の代わりに注意深いピペティング法および真空フィルタープレート法を用いた場合でも、序論およびFigure 1で論じたような他の問題が生じます。

Lysate Direct PhyTip® カラムは、迅速なDNAミニプレップを行うための代替の完全自動化ハイスループットソリューションを提供します。プラスミドDNAをPhyTip® カラムの末端で樹脂上に捕捉しますが、残屑や沈殿物の除去は必要ありません。したがって、遠心分離ステップは不要であり、全方法は完全なウオークアウェイ自動ワークフローに容易に適応されます。この方法を用いて、~19 µgの清浄なプラスミドDNAを再現性よく精製し、配列決定および哺乳動物トランスフェクションと適合することが示されました。

Lysate Direct PhyTip® カラムは、MEAパーソナル精製システム(PhyNexus)やTecan、Beckman、Caliper、Dynamic Devicesなどのいくつかの主流ロボットシステムで使用できます。

Lysate Direct PhyTip®カラムは、自動化PhyNexus MEAベンチトップ ウォークアウェイシステム用に特別に製造され、最大12サンプルを並行してランニングします。



Lysate Direct PhyTip® カラムは、ほとんどの液体ハンドリング ロボットシステムと96時間処理能力で互換性があります。

