

セルフシーリング型フィルターチップ PCR反応を阻害する可能性

はじめに

多くの場合、フィルター付きのピペットチップは、PCRタイプの反応でサンプルのクロスコンタミネーションを防ぐために使用されます。ほとんどのフィルターチップには100%ポリエチレン製のフィルターマトリックスが含まれますが、セルフシーリング型フィルターでは、液体と接触したときに「シーリング」するためのセルロースガムも使用されています。これらの添加剤はフィルターに結合していないため、通常の使用時にサンプル内に容易に堆積することがあります。

この実験の目的は、セルロースガム添加剤が含まれるフィルターとポリエチレンだけが含まれるフィルターによるPCR反応の阻害を定量化することです。セルフシーリング型フィルターと100%ポリエチレン製フィルターを水で洗浄したときの抽出液を使用して、PCR反応混合物を調製しました。これらの結果を、未処理の蒸留水を使用して調製したPCR混合物と比較しました。

材料と測定方法

独自のセルロースガムシーリング添加剤が含まれるMolecular Bio-Products ART-200ピペットチップ（バッチ#832010）のフィルターを50 μ Lの脱イオン蒸留水で洗浄し、室温で15分間培養しました。添加剤が含まれないレイニンエアゾール耐性チップ（品番30389186、ロット#4698G）のフィルターで同じ手順を実行しました。

個々の洗浄抽出液を使用して、次が含まれる同一のPCR反応混合物100 μ Lを調製しました。1pgのヒトゲノムDNA（Clontech社）、10 μ Lの10X PCRバッファ（Perkin-Elmer社）、5 μ Lの20mMヒトプライマーセット（Research Genetics社）、10 μ Lの25mM MgCl₂、8.0 μ Lの10mM dNTP（Perkin-Elmer社）、0.5 μ LのAmplitaq Gold（Perkin-Elmer社）。

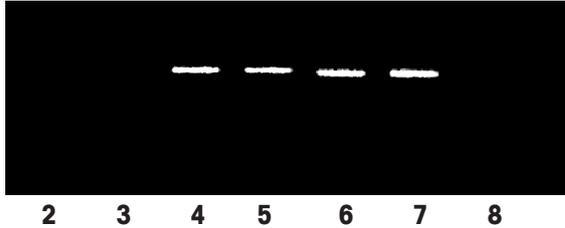
ポジティブコントロールとして使用するために、フィルター抽出液の代わりに脱イオン蒸留水を使用して同一のPCR混合物を調製しました。同じPCR混合物からヒトゲノムDNAを除外したものを使用してネガティブコントロールを調製しました。

PCR混合物を対象とし、GeneAmp PCR System 2400サーマルサイクラーを使用して、94 $^{\circ}$ Cで20秒間、50 $^{\circ}$ Cで20秒間、72 $^{\circ}$ Cで20秒間のサーマルサイクルを40回実施しました。

100 μ Lの各混合物を、臭化エチジウム（0.5 μ g/ μ L）が含まれる4%アガロースゲルに置き、80Vで20分間泳動させました。バンドを302nmで励起し、Kodak Digital Science EDAS 120システムで画像を撮影しました。

結果

レーン8はネガティブコントロール(DNAを含まないPCR混合物)です。レーン6と7は二連のポジティブコントロールです。レーン4と5は、レイニンの100%ポリエチレン製フィルターの抽出液からなるPCR反応混合物です。レーン2と3は、セルロースガム添加剤が含まれるARTフィルターからの抽出液を使用して調製したPCR混合物です。



レーン番号	内容	ポジティブ コントロールの%
2	セルフシーリング型フィルター	0
3	セルフシーリング型フィルター	
4	100%ポリエチレン製フィルター	94
5	100%ポリエチレン製フィルター	
6	ポジティブコントロール	N/A
7	ポジティブコントロール	
8	ネガティブコントロール	0

まとめ

レーン2または3ではDNAは検出されませんでした。これは、セルロースガム添加剤が含まれるARTフィルターから得られた抽出液がPCR反応を完全に阻害したことを示しています。このフィルター材料は取り扱い時または通常の使用時にフィルターマトリックスから剥離する傾向があるため、これは特に問題です。反応メカニズムによっては、セルロースガム添加剤がDNAまたは酵素を含むあらゆる反応を阻害することがあります。その他の阻害反応の程度については今後の実験で確認する予定です。