



## Agencourt DNAdvanceを用いた培養細胞からの長鎖ゲノムDNAの精製

### Summary

DNA抽出においてよりインタクトで長鎖のDNAを回収することは、次世代シーケンス用ライブラリやBACライブラリの調製において有用である。ここでは、培養細胞からのAgencourt DNAdvanceを用いたDNA抽出において得られるDNA長の検証を行った。その結果、得られたDNAは60 kb以上の長鎖で維持されており、非常に高品質なゲノム精製が可能であることが示された。さらに、この精製DNAから、PCRとシーケンシングによる良好なジェノタイピング結果も得られた。

### Materials and Methods

#### DNAdvanceによるDNA抽出と精製

浮遊系であるJurkat細胞を10万細胞を使用した。細胞からのDNA抽出・精製方法は、Agencourt DNAdvance (Beckman Coulter) のマニュアルから以下の点を改変した：

- Lysisの反応時間を、30分間に短縮した。
- 溶出は添付のElution Buffer 50  $\mu$ Lで行い、うち45  $\mu$ Lを回収した。

#### DNAの定量および評価

2本鎖DNAの定量は、Qubit 3.0 Fluorometer および Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)による蛍光定量法により行った。2本鎖DNA鎖長は、Agilent 2200 TapeStationおよびgDNAキット (Agilent Technologies) により測定した。

#### PCRおよびDNAシーケンシング

ALDH2\*1/\*2アレル領域のPCRは、以下のDNAプライマーを使用した。

Forward, 5' -CAAATTACAGGGTCAACTGCT-3'

Reverse, 5' -CAGACCCTAAATCCCTGGCA-3'

ExTaq (Takara Bio) 2.5 Unit、各0.2 mM dNTP、各プライマー 25 pmol、鋳型DNA 10  $\mu$ Lにて液量合計50  $\mu$ L、アニール温度55°C、30サイクルにて反応を行った。PCR産物は、Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter) により精製を行った。DNAシーケンシングは、Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific)、およびシーケンシングプライマーとしてForwardを使用した。

# Results

## Agencourt DNAdvance精製後のDNA収量

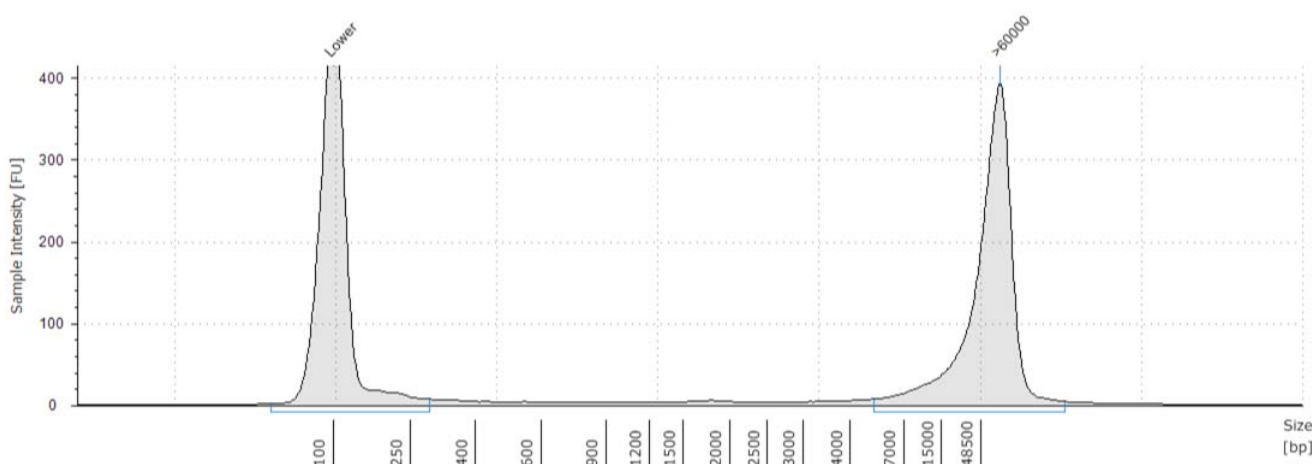
Jurkat細胞10万細胞から3回独立して精製を行った結果、Table Iに示す量の2本鎖DNAが得られた。

**Table I.** Jurkat細胞からの2本鎖DNA精製収量 (n = 3)

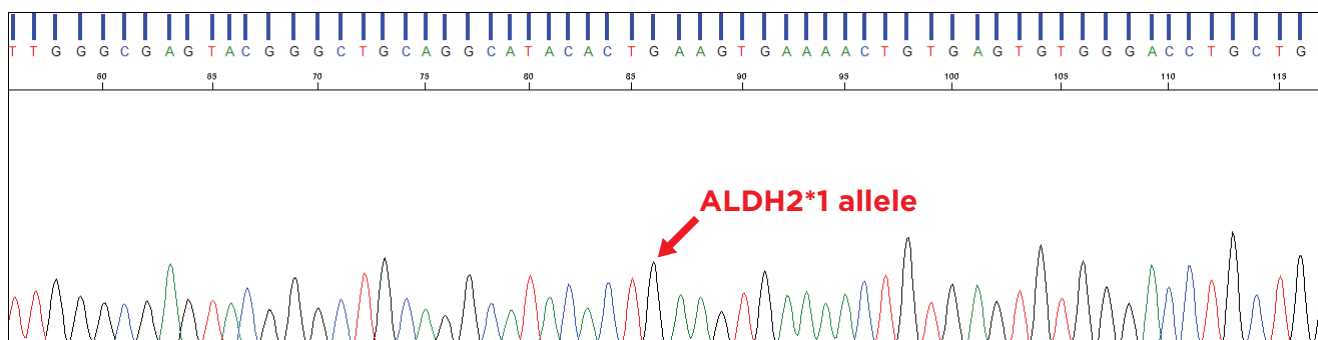
Sample	Elution volume (μL)	Purified dsDNA (ng)
Jurkat cells (100,000 cells)	45	763 ± 24.9

## 精製DNAの質的評価

精製DNAについて、Agilent 2200 TapeStationを用いた断片長測定による質的評価を行った。精製DNAのサイズは検出限界を上回る60 kb以上のピーク、精製指標となるDINは9.5という良好な数値であった (Figure 1)。



**Figure 1** Jurkat細胞から精製したDNAの断片サイズ評価。Lowerは内部マーカ。DIN = 9.5



**Figure 2** Jurkat細胞から精製したDNAのシーケンシングによる、ALDH2\*1アレルのタイピング解析

アセトアルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) のALDH2\*1/\*2アレルの周囲をPCRにより増幅し、サンガーシーケンスによるジェノタイピングを行った。Figure 2に示すとおり、良好なシーケンシング結果を得られ、ALDH2\*1アレルを明確にタイピングすることに成功した。

## Conclusions

Agencourt DNAdvanceによる培養細胞からのDNA抽出・精製では、高品質かつ高収量の長鎖DNAが得られることが示された。得られた長鎖ゲノムDNAは、サンガーシーケンス解析のほか、次世代シーケンス用の長鎖Mate-pairゲノムライブラリの調製などにも十分な品質と考えられる。さらに、遠心分離や吸引濾過を用いない磁性ビーズ精製法は、自動分注機システムでのハイスループットな自動精製にも対応しており、大量サンプルを処理する研究や遺伝子検査ラボなどでの使用にも適している。

## ベックマン・コールター株式会社

本社：〒135-0063 東京都江東区有明3-5-7 TOC有明ウエストタワー

お客様専用 ☎ 0120-566-730 ☎ 03-6745-4704 FAX 03-5530-2460  
e-mail bckkas@beckman.com URL <http://www.beckmancoulter.co.jp>