

Technical Data

口腔スワブを用いた FastGene™ ゲノムDNA抽出キット (口腔粘膜細胞) 評価試験

評価製品

FastGene™ ゲノムDNA抽出キット (口腔粘膜細胞)
 (FastGene™, Cat.No. FG-GD050S)

目的

口腔スワブからゲノムDNA (以下gDNA) を抽出し、
 FastGene™ ゲノムDNA抽出キット (口腔粘膜細胞) の性能を評価する。

実験概要

一般的なDNA抽出キットに含まれるスピカラムには、シリカメンブレンが使用されているが、スピカラムのフィルターに溶液が残りやすく、デッドボリュームが大きいという課題がある。

FastGene™ ゲノムDNA抽出キット (口腔粘膜細胞) のスピカラムには、次世代の分離媒体として注目されているシリカモノリスが使用されている。シリカモノリスは、ケイ酸エチルから合成された一体型の超高純度シリカゲルで、均一な細孔が無数に開いている網目状構造をもっている。この構造により、大きな通液空間と広い表面積を有するため、シリカメンブレンよりも圧倒的に通液性が良く、デッドボリュームも小さいため、より効率的に核酸精製が可能である。

本テクニカルノートでは、口腔スワブを用いてgDNAの抽出を行い、スピカラムの材質がシリカメンブレンである他社gDNA抽出キットの結果と比較することで、本製品の性能評価を行った。

評価方法

● サンプル

口腔スワブ (n=3)
 Isohelix Swab (Isohelix, Cat.No. SK-3 (20)) を用いて採取した。

● 使用キット

FastGene™ ゲノムDNA抽出キット (口腔粘膜細胞)
 Q社 gDNA抽出キット

● 評価項目

各キットの取扱説明書に従って抽出したgDNAを、以下の項目において比較・検討した。

- ① 工程数, 操作時間
- ② 収量
- ③ 純度
- ④ アガロースゲル電気泳動
- ⑤ PCRによる目的のアンプリコンサイズの確認

製品紹介

FastGene™ ゲノムDNA抽出キット (口腔粘膜細胞)

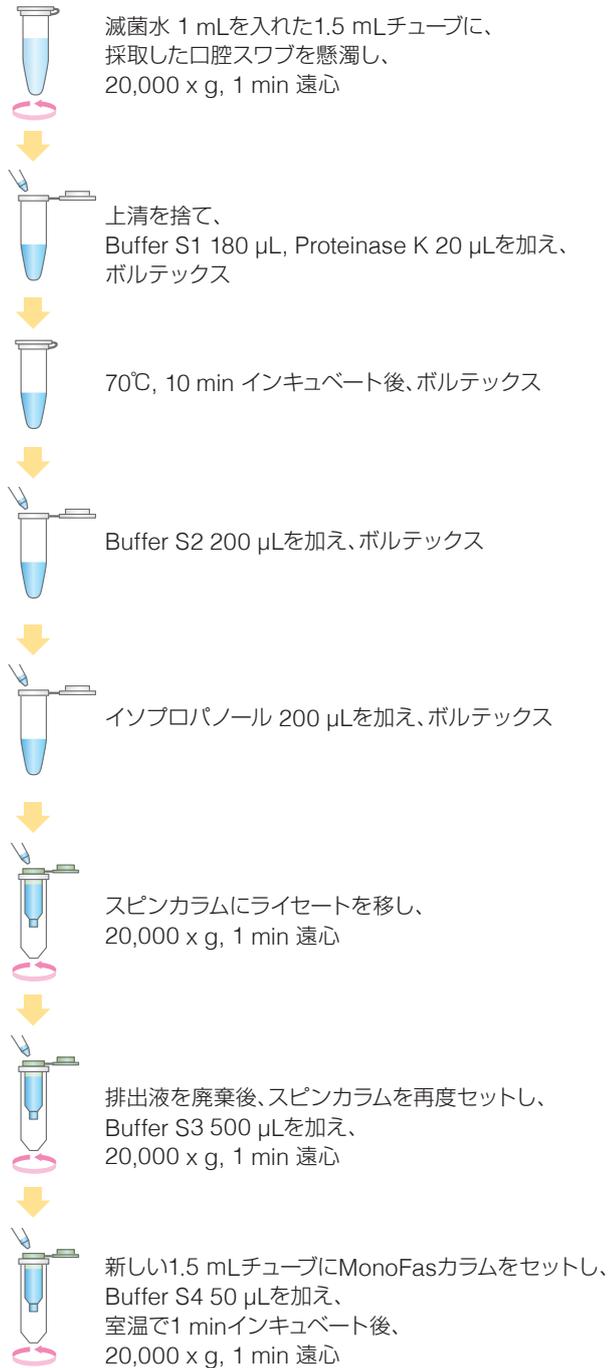
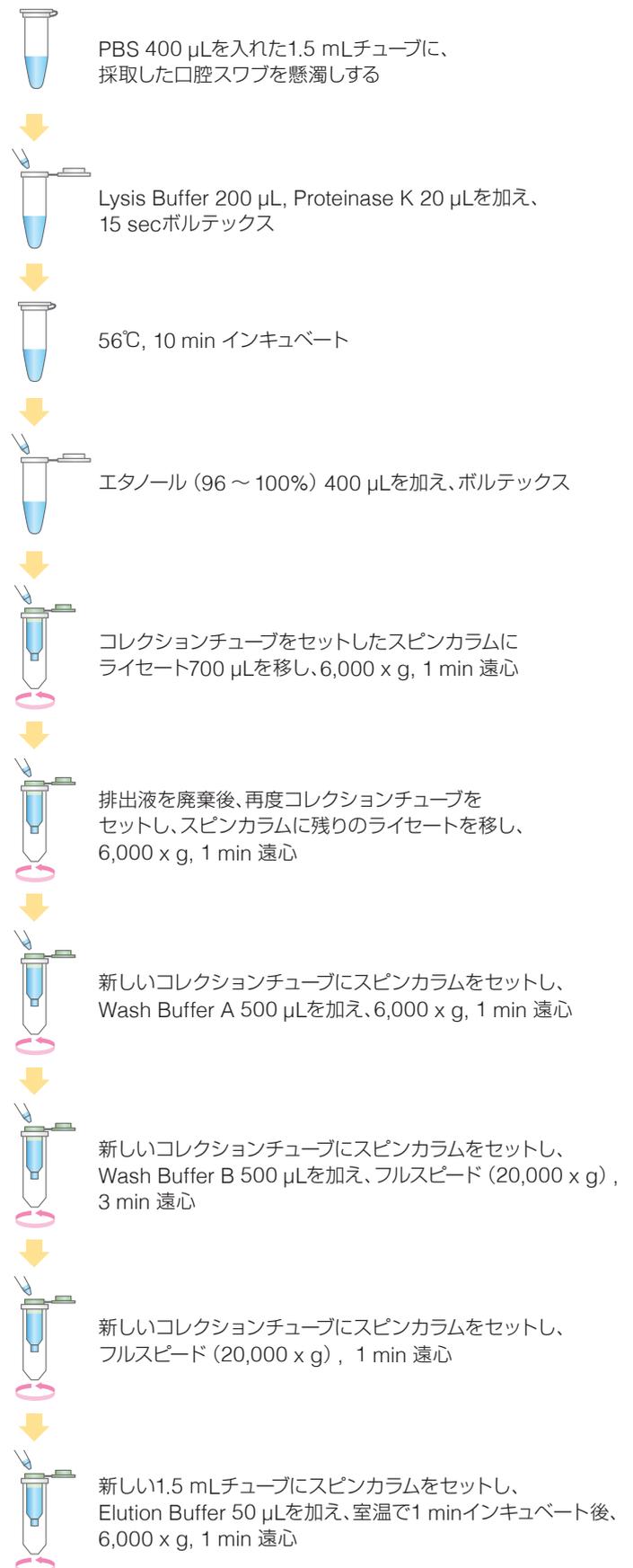
口腔粘膜細胞からのゲノムDNA抽出キットです。

洗浄バッファー (Buffer S3) にはエタノールが含まれているため、別途エタノールを添加する必要がありません。



● キット構成内容

- スピカラム
- Buffer S1 (懸濁)
- Buffer S2 (溶解/吸着)
- Buffer S3 (洗浄)
- Buffer S4* (溶出)
- Proteinase K (20 mg/mL)
- *10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (pH 8.5)

● 各キットの操作方法
FastGene™ ゲノムDNA抽出キット (口腔粘膜細胞)

Q社 gDNA抽出キット


結果

① 工程数, 操作時間

キット	工程数	操作時間 (n=3抽出時)
FastGene™ ゲノムDNA 抽出キット (口腔粘膜細胞)	8	33 min 30 sec
Q社 gDNA 抽出キット	10	35 min

FastGene™ ゲノムDNA抽出キット (口腔粘膜細胞) は、洗浄工程における操作が少なく、Q社 gDNA抽出キットよりも短時間で、gDNAを抽出することができた。

② 収量

Qubitによる測定 (n=3の平均を算出)

キット	Conc. (ng/μL)	Elution (μL)	Yield (ng)
FastGene™ ゲノムDNA 抽出キット (口腔粘膜細胞)	22.2	50	1111
Q社 gDNA 抽出キット	41.2	50	2060

装置 : Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Cat.No. Q33238)

キット : Qubit dsDNA BR Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Cat.No.Q32850)

収量はQ社 gDNA抽出キットよりも低いが、ダウンストリームのアプリケーションに使用するには十分な濃度のgDNAを得ることができた。

③ 純度

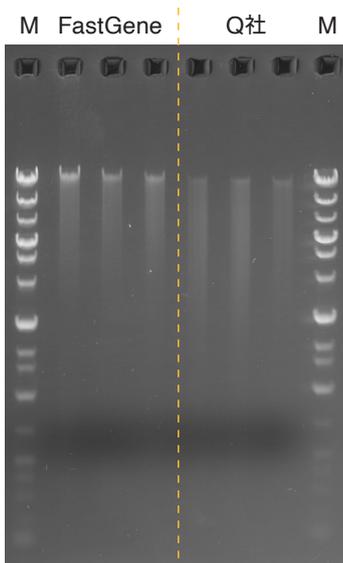
NanoDrop One^cによる測定 (n=3の平均を算出)

キット	A260/A280	A260/A230
FastGene™ ゲノムDNA 抽出キット (口腔粘膜細胞)	2.09	2.21
Q社 gDNA 抽出キット	1.90	2.23

装置 : NanoDrop One^c (Thermo Fisher Scientific, Cat.No. ND-ONEC-W)

A260/A280とA260/A230はいずれも、Q社キットと同等の結果だった。

④ アガロースゲル電気泳動



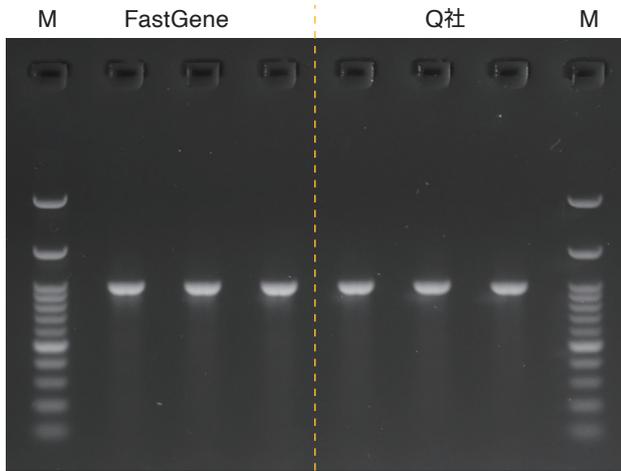
● 電気泳動条件

- ゲル : 1.0 % アガロースゲル
- バッファー : 1 x TAE
- 泳動条件 : 100 V, 60 min
- 泳動槽 : SafeBlue Illuminator/ Electrophoresis System (Major Science, Cat.No. MBE-150-PLUS)
- 核酸染色試薬 : Midori Green Xtra (FastGene, NE-MG10), 先染め染色法
- DNAマーカー : Gene Ladder wide 1 (0.1 – 20 kbp) (ニッポンジーン, Cat.No. 313-06961)
- 撮影装置 : FAS-Digi Compact (日本ジェネティクス株式会社, Cat.No. GP-08LED)
- 撮影条件 : F=5.6, Exposure 1.3 sec, ISO=100

gDNAのバンドを確認することができた。

⑤ PCRによる目的のアンプリコンサイズの確認

KAPATaq Extra Hot Start ReadyMix with dye (KAPA BIOSYSTEMS, Cat.No. KK3606) を用いて、アンプリコンサイズ 986 bp の PCRを行った。



● 電気泳動条件

- ゲル : 1.5 % アガロースゲル
- バッファー : 1 x TAE
- 泳動条件 : 100 V, 25 min
- 泳動槽 : SafeBlue Illuminator/ Electrophoresis System (Major Science, Cat.No. MBE-150-PLUS)
- 核酸染色試薬 : Midori Green Xtra (FastGene, NE-MG10), 先染め染色法
- DNAマーカー : 100bp DNA Ladder PLUS (FastGene, Cat.No. NE-MWD100P)
- 撮影装置 : FAS-Digi Compact (日本ジェネティクス株式会社, Cat.No. GP-08LED)
- 撮影条件 : F=5.6, Exposure 1/3 sec, ISO=200

すべての抽出gDNAで目的サイズの増幅が確認され、PCR阻害等の問題はなかった。

まとめ

FastGene™ ゲノム DNA 抽出キット (口腔粘膜細胞) は、洗浄工程の工程が少なく、短い操作時間でgDNAを抽出することができた。また、スピнкаラムの液切れが良いため、スピнкаラムの乾燥工程である空遠心を行わなくても、不純物やバッファーを効率よく除去することができる製品である。

補 足

PCRによる目的のアンプリコンサイズの確認におけるPCR条件

● 反応液組成

Component	Volume
2X KAPA Taq Extra HotStart Ready Mix with dye	5 μ L
10 μ M Forward Primer	0.2 μ L
10 μ M Reverse Primer	0.2 μ L
Template DNA	2 μ L
PCR-grade water	2.6 μ L
Total	10 μ L

● 反応条件

Step	Temperature	Time	Cycle
Initial Denaturation	95°C	3 min	-
Denaturation	95°C	30 sec	35 Cycles
Annealing	60°C	30 sec	
Extension	72°C	1 min	
Final Extension	72°C	1 min	-
Hold	4°C	∞	-

● プライマー

human actin beta (ACTB) gene
 Forward Primer : 5' -GGCCATGAGGCTGGTGTA-3'
 Reverse Primer : 5' -CTGGATGTGACAGCTCCCA-3'
 アンプリコンサイズ : 986 bp