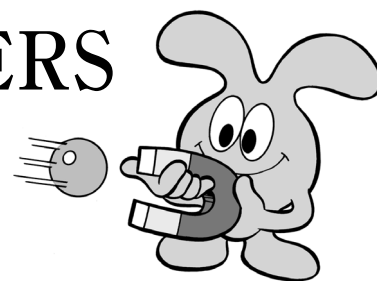


DYNABEADS LETTERS



免疫磁気ビーズを用いたDNA抽出方法 血液からDNAを簡単にとる方法

日本赤十字社中央血液センター
検査部 宮本正樹

1. 目的

HLA のDNA タイピングを行なうために、免疫磁気ビーズを用いて血液からDNAを簡単に抽出する。

2. 原理

免疫磁気ビーズを用いてヒト末梢血から分離したリンパ球に、プロテイナーゼK 酵素 (PK) と界面活性剤 (Tween 20) を加え (図1)、細胞膜や核膜をすばやく壊し、その中の DNA を短時間に取り出す。

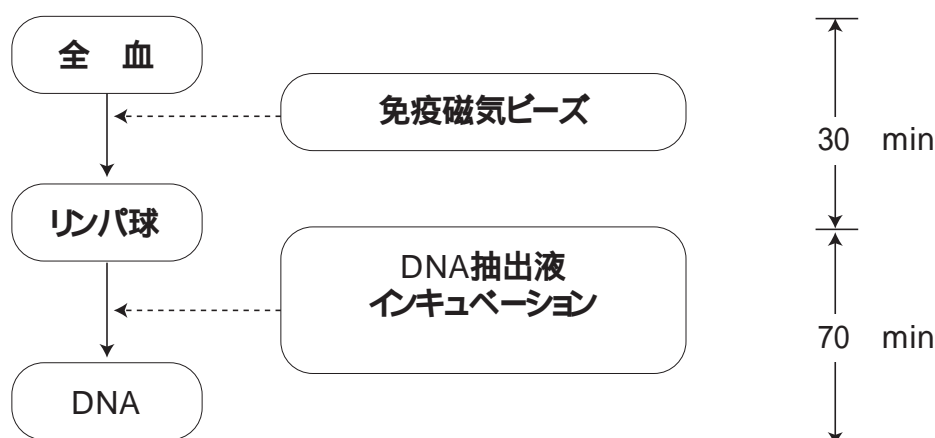


図1 免疫磁気ビーズを用いたDNA抽出法の概略と操作時間

3. 利点

- 免疫磁気ビーズで分離したリンパ球は、きわめて純度が高く、PCR (polymerase chain reaction) を阻害するヘモグロビンの混入がきわめて少ない。
- 安定した数のリンパ球 (10^6 cells) が得られ、DNA 濃度はほぼ一定である。
- DNA の抽出は、リンパ球に抽出液を加え、インキュベートするだけである(図1参照)。
- 有機溶媒を使用しないので、操作性がよく、安全である。
- 抽出時に、チューブ間の移し代えがない。
- 多検体処理にも適している。
- 血清学的なHLA タイピングで残ったリンパ球からも直接 DNA が抽出できる。
- HLA 検査だけではなく、血小板抗原の DNA タイピングにも応用できる。

4. 用意するもの

4-1 リンパ球分離用

【器具】

- ・ 7ml 用試験管 (ネオチューブ、NT - PS 5707、ニプロ社製)
- ・ パスツールピペット
- ・ 遠心分離機 (3,000 rpm までの遠心が可能な機種)
- ・ ダイナビーズ磁気分離装置(ダイナル MPC - 6 など)。試験管を立てる磁石付ラックで、免疫磁気ビーズに結合した細胞を分離するために使用する。
- ・ 振盪機 (Robbins 社ローテーター、水平振盪機 (Slide Roter) 等)。免疫磁気ビーズと血液を効率よく接触させるために使用し、多検体処理には必須である。少数検体では、手でゆっくり静かに転がすように混和してもよい。

【試薬】

- ・ リン酸塩緩衝液 (PBS)
下記の組成で調製し、4℃ で保存する。

NaH ₂ PO ₄ ・H ₂ O	0.157 g
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	1.98 g
NaCl	8.1 g
滅菌蒸留水	1,000 ml

- ・ 0.6% クエン酸ナトリウム加 PBS
クエン酸ナトリウムをPBS に溶解させ、最終濃度0.6% に調製し、4℃ で保存する。
0.6% のクエン酸ナトリウムは、PBS のpH や浸透圧を大きく変えることなく、粘着細胞の凝集、粘着、貪食反応や凝固形成を抑制させる。
- ・ 0.1% BSA (子ウシ血清アルブミン) 加 PBS
BSA をPBS に溶解させ、最終濃度 0.1% に調製し、4℃ で保存する。
免疫磁気ビーズを使用前に洗浄し、保存中にビーズから遊離した抗体および防腐剤のアジ化ナトリウムを除く。
遊離した抗体は、標的細胞と結合して、ビーズとの結合を阻害する。アジ化ナトリウムは、細胞機能を低下させる。PBS 中のBSA は、ビーズの非特異凝集や洗浄ロスを低下させる。
- ・ 免疫磁気ビーズ (ダイナビーズ HLA クラス I とダイナビーズ M-450 CD4)
リンパ球の回収を高めるために、2 種類のビーズ(CD4およびCD8リンパ球分離用)を等量混ぜて使用する。

4-2 DNA 抽出用

【 器具 】

- ・ 1.5ml用サンプルチューブ
- ・ 高速遠心分離機(12,000 rpm 程度の遠心が可能な機種)
- ・ アルミブロック恒温槽 (Dry Thermo Unit、DTU-1B、タイテック社製)
細胞内からDNAを取り出すために、タンパク質を分解するPK の働きを高める加温装置。サーマルサイクラー(PCR 増幅器)でも可能。

【 試薬 】

- ・ DNA抽出液 (PK 液)¹⁾
細胞内からDNAを取り出す溶液で、下記の組成のものを使用する。

×10 PCR Buffer ²⁾	20 μl
10 % Tween 20 ²⁾	10 μl
20 mg/ml PK ⁴⁾	5 μl
滅菌蒸留水	165 μl
1 検体分	200 μl

- 1) PK 液を小分けし-20 で保存後、必要量を解凍し使用すると便利。
- 2) ×10 PCR Buffer (市販のタックポリメラーゼに添付されているものを使用。タカラタック、タカラ社製など)

100 mM	Tris-HCl (pH8.3)
500 mM	KCl
15 mM	MgCl ₂
0.01%	ゼラチン

- 3) 10% Tween 20 (Tween 20 (和光純薬社製)を滅菌蒸留水に溶解し、最終濃度10%に調製)
- 4) PK (Proteinase K、1.25 mlまたは5 ml 用、ペーリンガー社製)

5. 方法

5-1 免疫磁気ビーズ法によるリンパ球の分離

【 注意 】

本リンパ球分離法は、HLA のクラスI (HLA-A、B、C) 検査を血清学的手法で行い、同時にHLA のクラスII (DR、DQ) 検査をDNAタイピング法でルーチン的に実施するために、同一のリンパ球からDNAを抽出する手法を示す。クラスIIのDNAタイピングのみを目的としたDNA抽出には、必要に応じて血液量を5~0.5 mlとする。検体数が少ない施設では、ベリタス社のダイナビーズマニュアルに従ってリンパ球分離を行ってもよい。操作温度は、リンパ球の収量に大きく影響を及ぼすために、十分注意する。

- 1) 事前に、7 ml 用試験管に 0.6 % クエン酸ナトリウム加 PBS (4) を 0.5 ml 入れ、アイスバス中で保冷しておく。
- 2) 10ml 採血した全血 (ネオチューブ、CPD 液、NT - SC1000、ニプロ社製) を遠心 (2,000 rpm、10 分間、25) 後、血漿を除去する。
 - 注) ・血液は、採血後3日間、室温(25 前後)で保存可能。抗凝固剤は、ACD (acid-citrate-dextrose) 液または CPD (citrate-phosphate-dextrose) 液のクエン酸塩系がよい。
- 3) 0.6% クエン酸ナトリウム加PBS を約 5 ml 加え混和後、遠心(3,000 rpm、5 分間、25) し、上清を除去する。
 - 注) ・操作 2) で残った血漿を洗い出すと、操作 4) でパフィーコート(白血球層)が取りやすく、またリンパ球の収量がよい。
- 4) パフィーコートをパスツールピペットで0.5ml採取し、操作1)の試験管に移し、5分間氷水中で冷却させる。
 - 注) ・パフィーコートの採取は、血漿と赤血球の混入をできるだけ少なくする。
 - ・ダイナビーズとパフィーコートの反応時、水平振盪機を使用しながら冷却を続けることが困難なため、ここで十分予冷する。
- 5) ダイナビーズを25 μ l 加える。
 - 注) ・使用前に0.1% BSA 加 PBS を加え、ダイナビーズ分離装置に5 分間静置させ、洗浄後再浮遊させて使用する。
- 6) 水平振盪機により200 rpm、5分間、十分冷却した細胞とビーズを混和させる。
- 7) 上記試験管をダイナビーズ分離装置に立て、室温で2 分間静置させる。
 - 注) ・自動洗浄装置 (ビーズウォッシャー、バイオテック社製) を用いると、操作 11) までが自動で行える。洗浄の自動化は、再現性(バラツキなく、安定した結果が得られる)、確実性(検体の破損)、多検体処理性(12 検体同時処理)、血液からの感染防止等に優れている。DNA抽出だけを目的とした少数検体からのリンパ球分離には、DYNAL MPC-E (標準マイクロタイプ、容量1 ~ 1.5 ml のエッペンドルフ型のマイクロ遠心チューブ 6本用) が便利である。
- 8) ダイナビーズ分離装置を傾け、上清(血液)を捨てる。
- 9) PBS (4) を約 6 ml 加え、1 分間静置させる。
 - 注) ・PBS を事前に冷やしておく。洗浄液の冷却は、リンパ球の収率を高める。
- 10) 上清を捨て、回収する血球を洗浄する。
- 11) 洗浄操作を計4 回行い、逆さのまま PBS をよく切る。
- 12) ダイナビーズで分離したリンパ球を 500 μ l のマッコイ液またはPBSに浮遊させ、そのうち200 μ l を1.5 ml 用サンプルチューブに移し、遠心(3,000 rpm、5 分間、25) 後、上清を除去する。
 - 注) ・残りのリンパ球浮遊液は、血清学的HLA検査に使用する。

5-2 PK 液による DNA 抽出

- 1) 上記操作12) のリンパ球沈渣に、PK 液を200 μ l 加え、混和する。
- 2) 56 のアルミブロック恒温槽にて、60 分間インキュベートさせる。
 - 注) ・1 日間のインキュベート可能。
 - この条件下では、タンパク質が分解変性し、DNA がタンパク質から解離する。また、この温度では、細胞内のDNA 分解酵素 (DNアーゼ) は働かず、DNA の分解が起こらない。
- 3) 95 のアルミブロック恒温槽にて、10 ~ 60 分間インキュベートさせる。
 - 注) ・この操作で、PK を失活させる。サーマルサイクラーを使用する場合、56 /60分間 95 /10分間 4 。
- 4) PCR 使用に際し、遠心 (12,000 rpm、5 分間、4) 後、上清を使用する。
 - 注) ・保存は、-20 で行なう。

6. 備考

- ・ 当施設では、本法で得たDNAを用いて、PCR - MPH (microtiter plate hybridization)法、PCR - SSCP (single - strand conformation polymorphism)法、PCR - RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法、PCR - SSP (sequence specific primer) 法等による DNA タイピングをルーチン検査として実施している。
- ・ 各施設で PCR を行なう場合、PCR bufferの組成、プライマー濃度等に対する DNA 濃度を確認する。通常、PCR 反応液の 1/10 ~ 1/100 量の DNA で PCR が実施できる。
- ・ DNA サンプルの長期保存は、-20 で行い、凍結融解を頻繁に繰り返さない。また、激しい攪拌等により DNA が物理的に切断されないように注意する。

お問合せは 日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL(03)593-3211【代】 FAX(03)593-3216