

分子生物学用Thermo Scientific Nunc ストレプトアビジンコーティングプレート

キーワード

ストレプトアビジンコーティング、コーティングプレート、PCR-ELISA、キャプチャーオリゴヌクレオチド、DNAハイブリダイゼーション

目的

ここでは、まずDNAハイブリダイゼーションアッセイを実施して、Thermo Scientific™ Nunc™ ストレプトアビジンコーティングプレートのキャプチャーオリゴヌクレオチド結合能力を調べました。さらに、PCR-ELISAを実施して、Nuncプレートへのハイブリダイゼーションおよび検出が可能なPCR産物の量を推定しました。

Nuncストレプトアビジンコーティングプレートは、ビオチン化された比較的小さい分子の結合に向いているため、分子生物学ならびに免疫学の多くのアプリケーションに利用できます。本アプリケーションノートでは、Nuncストレプトアビジンコーティングプレートと主要メーカーからの2種類の異なるストレプトアビジンコーティングプレートを、DNAハイブリダイゼーションアッセイおよびPCR-ELISAを実施して比較した結果をご紹介します。

方法

ストレプトアビジンコーティングプレートへのキャプチャーオリゴヌクレオチドの結合

キャプチャーオリゴヌクレオチドは、5'末端にビオチン基と10個のチミジンからなるスパーサーを有しています。100 mMのTris-HCl (150 mMのNaClおよび0.1%のTween™ 20を含む、pH 7.5) 中に100 nMのキャプチャーオリゴヌクレオチドおよびさまざまな濃度の遊離ビオチン (0 nM~50,000 nM) を含むコーティングミックス100 μ Lを各ウェルに添加しました。ウェルを密封し、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションしました。150 mMのNaClおよび0.1%のTween 20を含む100 mMのTris-HCl (pH 7.5) を使用して、室温でウェルを3回洗浄し、5分間浸漬した後、さらに3回洗浄しました。

ハイブリダイゼーション

0.25 nMの5'末端フルオレセイン標識検出プローブおよび50 nMの非標識検出プローブをハイブリダイゼーションバッファー (0.1%のTween 20および0.5%のブロッキング試薬を含む5 x SSC) に溶解した溶液100 μ Lを各ウェルに添加し、50 $^{\circ}$ Cでサンプルのハイブリダイゼーションを1時間行いました。ハイブリダイゼーション後、0.1%のTween 20を含む0.5 x SSCを使用して、ウェルを3回洗浄し、15分間浸漬しさらに3回洗浄しました。



フルオレセイン結合アルカリホスファターゼ標識抗体を150 mMのNaCl、0.1%のTween 20および0.5%のブロッキング試薬を含む100 mMのTris-HCl (pH 7.5) で500倍に希釈し、100 μ Lを各ウェルに添加しました。ウェルを50 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションし、150 mMのNaClおよび0.1%のTween 20を含む100 mMのTris-HCl (pH 7.5) を使用して、室温でウェルを3回洗浄し、5分間浸漬した後、さらに3回洗浄しました。

100 μ Lの基質溶液 (1 Mジエタノールアミン (pH 9.8) に溶解した1 mMの4-メチルウンベリフェリルリン酸塩と1 mMのMgCl₂) を添加し、50 $^{\circ}$ Cで30分間酵素反応を行いました。蛍光プレートリーダーで蛍光シグナルを読み取りました (励起355 nm、発光450 nm)。

PCR増幅および検出

増幅反応は、バッファー (50 mMのKClおよび0.1%のTween 20を含む10 mMのTris-HCl (pH8.3)) 中に2.5 mMのMgCl₂、1 mg/mLのBSA、4 μ MのDIG-11-dUTP、0.1 mMのdTTP、0.2 mMのdATP、dCTP、dGTP、0.5 μ Mの各プライマー、1 UのTaq DNAポリメラーゼおよびDNAテンプレート (10⁻¹⁵ M) を含む合計50 μ Lの容量で行いました。PCRサイクルは、94 $^{\circ}$ Cで10分間保持した後、94 $^{\circ}$ Cで25秒、55 $^{\circ}$ Cで25秒、72 $^{\circ}$ Cで25秒を1サイクルとして35サイクルの増幅反応を行い、続いて72 $^{\circ}$ Cで10分間1サイクルを実行しました。PCR増幅産物を1%アガロースゲル上で解析し、定量しました。増幅産物を段階希釈し、希釈液10 μ Lを10 μ Lの1 M NaOHで変性させました。変性PCR産物を80 μ Lの0.625 x SSC、0.625%ブロッキング試薬、0.125% Tween 20、0.5 M NaH₂PO₄ (pH 6.5) を含有するストレプトアビジンコーティングプレートに移しました。ウェルを50 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベーションし、0.1%のTween 20を含む0.5 x SSCを使用して、室温で

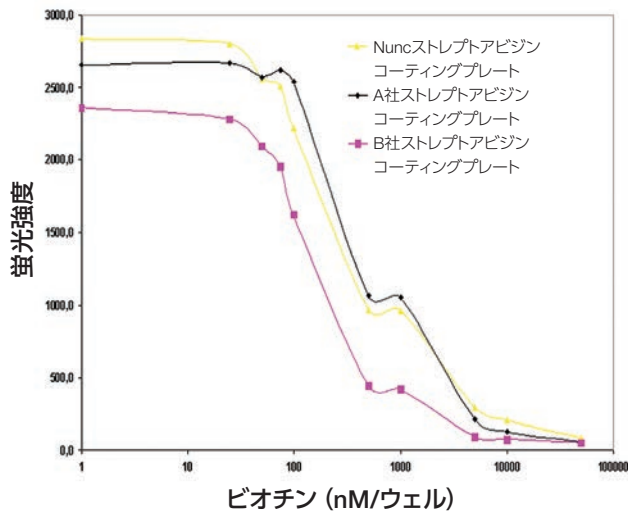


図1. DNAハイブリダイゼーションアッセイ

ウェルは100 nMのビオチン化キャプチャーオリゴヌクレオチドおよびさまざまな濃度の遊離ビオチンでコーティングされています。キャプチャーされたオリゴヌクレオチドの量を、フルオレセイン標識した検出プローブとのハイブリダイゼーションにより測定しました。ハイブリダイズしたDNAの量が任意単位の蛍光シグナルとして示されています。抗体の非特異的結合によるバックグラウンド蛍光レベルは、試験を行った全てのプレートで2.5%未満でした（結果は示してありません）。

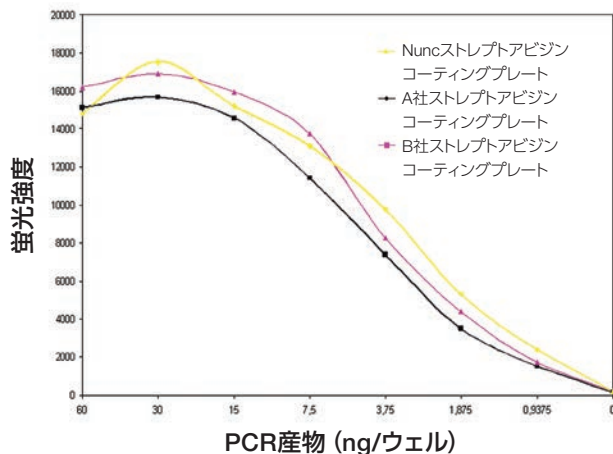


図2. PCR-ELISA

streptavidin-coated plate上のPCR産物の検出しました。変性させたジゴキシゲニン標識PCR産物をstreptavidin-coated plateに固定されたプローブによりキャプチャーし、アルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体で検出しました。検出レベルが任意単位の蛍光シグナルとして示されています。

ウェルを3回洗浄し、50 °Cで15分間浸漬した後、さらに3回洗浄しました。各ウェルに、150 mMのNaCl、0.1%のTween 20および0.5%のブロッキング試薬を含む100 mMのTris-HCl (pH 7.5) で500倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体100 μ Lを添加しました。上記のハイブリダイゼーションの項と同一の方法で検出を行いました。

DNAハイブリダイゼーションアッセイ

DNAハイブリダイゼーションアッセイにより、streptavidin-coated plateのビオチン化オリゴヌクレオチド結合能力を調べました。

100 nMのビオチン化キャプチャーオリゴヌクレオチドと、さまざまな濃度の遊離ビオチンをstreptavidin-coated plate表面に添加しました。キャプチャーされたオリゴヌクレオチドを、フルオレセイン標識したオリゴヌクレオチド検出プローブとのハイブリダイゼーションにより検出しました。Nunc streptavidin-coated plateと主要メーカーからの2種類の異なるstreptavidin-coated plateの試験を行いました（図1）。Nunc streptavidin-coated plateは、主要メーカーからのプレートと同等またはより優れた感度を有していました。

PCR-ELISA

Nuncプレートへのハイブリダイゼーションおよび検出が可能なPCR産物の量を推定するために、PCR-ELISAを実施しました。ジゴキシゲニン標識したPCR増幅産物の連続希釈サンプルをウェルに添加し、ハイブリダイゼーションしたPCR産物の量をアルカリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体で検出しました。図2からは、Nunc streptavidin-coated plateが主要メーカーからのプレートと同等の感度を有していることがわかります。2.3 $\times 10^{-15}$ MIに相当する0.45 ngのPCR産物を検出することが可能です。streptavidin-coated plateは、ゲル電気泳動によるPCRアンプリコン検出の10倍の感度を提供します。

また、ELISAを使用することで、より多くのサンプルの分析を容易に行うことができます。

結論

Nunc streptavidin-coated plateを使用することで、2.3 $\times 10^{-15}$ MIに相当する0.45 ngのPCR産物を検出することが可能です。

研究用のみ使用できます。診断用には使用いただけません。これらの製品は一般的なラボでの使用を目的としています。

製品の性能がお客様の用途やアプリケーションに適しているかどうかはお客様自身でご確認ください。

© 2023 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

Tween is a trademark of Croda Americas LLC.

実際の価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 [thermofisher.com/jp-tc](https://www.thermofisher.com/jp-tc) **LSP078-A23070B**

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jpotech@thermofisher.com

オーダーサポート TEL: 03-6832-9260 FAX: 03-6832-9261

営業部 TEL: 03-6832-9270 FAX: 03-6832-9271

facebook.com/ThermoFisherJapan @ThermoFisherJP

[thermofisher.com](https://www.thermofisher.com)