

MultiNA™を用いたゲノム編集による 数塩基変異の検出

ゲノム編集技術の登場で、標的遺伝子に対して、特異的に遺伝子を破壊したり、導入することが容易にできるようになりました。

ゲノム編集結果の確認にはオンターゲットに対する変異の有無を確認することが必要です。直接配列を解析する方法が一番確実ですが、多検体での検証を行う場合にはコストがかかります。簡易的な方法として、野生型と変異型とのヘテロ二本鎖を電気泳動にて分析し、ホモ二本鎖とヘテロ二本鎖の移動度の差を利用した確認方法があります（ヘテロ二本鎖移動度解析：HMA 法）。この方法は全自動電気泳動装置を利用することで手軽にゲノム編集結果を確認できるツールとして普及しています。

しかしながら、HMA は数塩基（1~5 bp）の違いではホモ二本鎖とヘテロ二本鎖の立体構造による移動度の差が相殺されて編集の有無を確認できない場合があります。このような場合に利用できるのが T7 Endonuclease1 や Cel1 と呼ばれる酵素を利用する方法です。これらの酵素は二本鎖 DNA のミスマッチを認識し、切断する活性があります。数塩基のミスマッチも認識できるとされており HMA などでは検出できない変異に有効だとされています。ここでは T7 Endonuclease1 によるミスマッチの切断をマイクロチップ電気泳動装置により簡便迅速に検出する分析例を紹介します。

Y. Sogabe

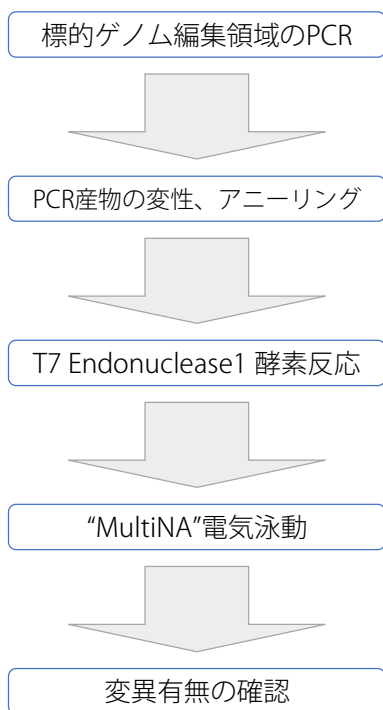


図1 分析プロトコル



図2 DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA™

■ 標準試料の準備

分析には Homo sapiens beta globin region (HBB@) 及び beta globin locus transcript 3 (non-protein coding) (BGLT3) の中から任意の 110 bp を設定しました。これを野生型のモデルとしました。野生型のモデル配列からそれぞれ 1 塩基から 5 塩基挿入もしくは欠失させた 5 種類の変異型のモデル DNA を設定しました。それぞれをプラスミドに挿入したものを合成しました。PCR の際に野生型と各 5 種類の変異型の 2×10^8 コピーを 1:1 の割合でそれぞれ混合し野生型 - 変異型のヘテロモデルの鋳型として用いました。

■ 方法

• PCR

PCR は表 1 の条件にて実施しました。

表 1 PCR 分析条件

PCR反応液	
Sample	0.5 μ L
2xBuffer	5.0 μ L
dNTPs (2 mM)	1.0 μ L
Primer F (2 μ M)	1.0 μ L
Primer R (2 μ M)	1.0 μ L
DW	1.4 μ L
KOD FX	0.1 μ L
Total	10.0 μL
PCRサイクル	
98 $^{\circ}$ C	1 min
98 $^{\circ}$ C	10 sec
60 $^{\circ}$ C	15 sec
68 $^{\circ}$ C	15 sec
68 $^{\circ}$ C	7 min
4 $^{\circ}$ C	∞
	} x35 cycles

• ヘテロ二本鎖形成

サーマルサイクラーを用いて PCR 産物の変性とアニーリングを行いました。条件はニッポンジーン社製 T7 Endonuclease1 reaction Mix 添付のプロトコルに従いました。

95°C	5min
95°C→85°C	2°C/sec
85°C→25°C	0.1°C/sec

• 酵素反応 (T7 Endonuclease1)

ヘテロ二本鎖を形成した PCR 産物を 9 μL 用いて T7 Endonuclease1 reaction Mix を 1 μL 加えて 37°C 60 min 反応を行いました。

• 電気泳動

T7 Endonuclease1 で酵素処理した PCR 産物をマイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA で電気泳動を行い、サイズの確認を行いました。比較のために T7 Endonuclease1 で処理していない PCR 産物の電気泳動も行いました。MultiNA での分析は MultiNA 専用の DNA-500 キットを用いました。

■ 分析結果

MultiNA による電気泳動から図3のような明瞭な分析結果 (ゲルイメージ) を得ることができました。サンプル名に Δ1・・・・・Δ5 と示してあるのは挿入もしくは欠失の数を表しています。

(a)は T7 Endonuclease1 処理前の PCR 産物のゲルイメージです。熱変性、アニーリングの処理を実施する前ですが、5塩基の indel がある Δ5 についてはヘテロ二本鎖が検出されており、T7 Endonuclease1 処理なしでも変異と確認できました。

(b)は T7 Endonuclease1 処理した PCR 産物のゲルイメージです。Δ1 から Δ5 すべてにおいて T7 Endonuclease1 による切断を受けたフラグメントがそれぞれ検出されています。消化されたフラグメントのサイズがそれぞれ異なるのは挿入もしくは欠失を設定した位置が異なるためです。ヘテロ二本鎖が検出されていた Δ5 につきましては T7 Endonuclease1 によりヘテロ二本鎖が消失しているのが確認できました。

■ まとめ

本分析例のように野生型ホモと変異型ホモのサイズ差を数塩基差で分離することが厳しい場合、T7 Endonuclease1 を利用してその切断片を検出することにより簡便に変異の有無を判定することができます。

実験動物の個体数が多い場合、ゲノム編集の有無を判別するのは手間とコストを要します。MCE-202 MultiNA を使用した自動分析はその作業を大幅に節減することができます。

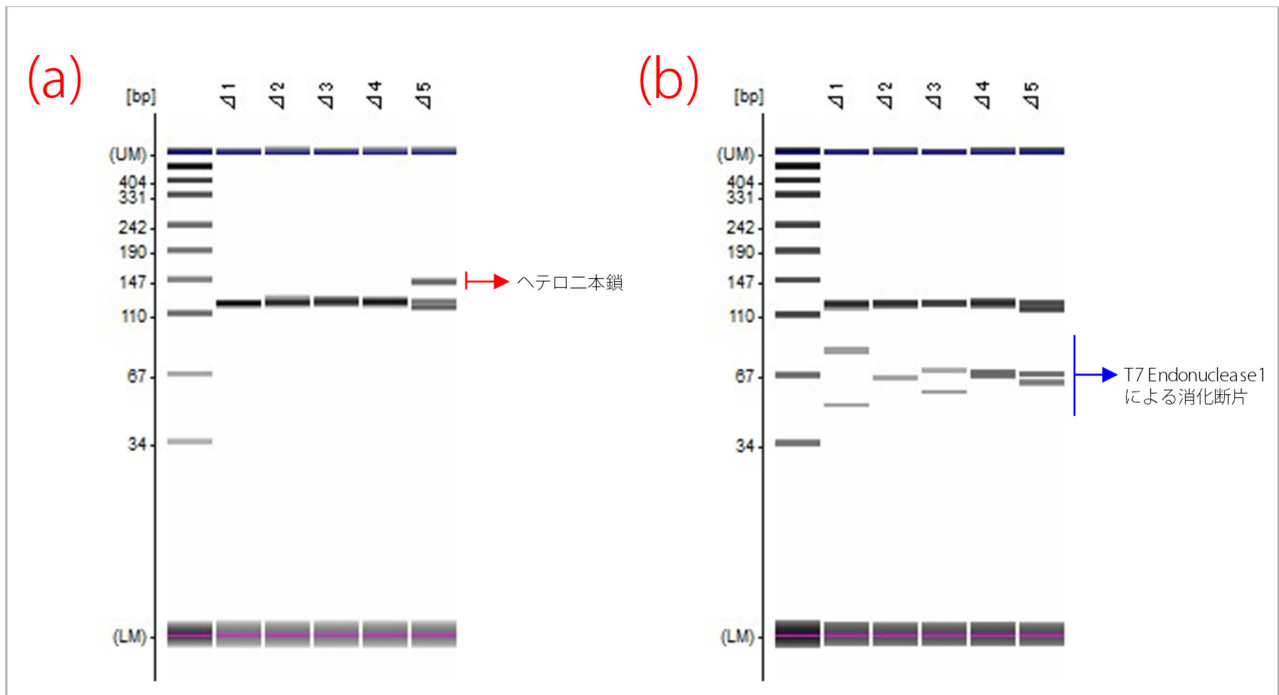


図3 MultiNA による電気泳動結果 (ゲルイメージ)
(a) PCR 終了後のゲルイメージ、(b) T7 Endonuclease1 処理した PCR 産物のゲルイメージ

※本法はターゲット配列やその周辺の配列により分析結果が異なることがあります。

MultiNA は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。その他、本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年3月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。