

卓上型両極性MALDI-8030を用いた合成オリゴヌクレオチドの負イオンモード分析

S. Salivo¹、山崎雄三
¹KRATOS ANALYTICAL LTD.

ユーザーベネフィット

- ◆ 比較的安価な卓上型MALDI-TOFMSによる負イオンモードで、オリゴヌクレオチドの塩付加体を排除して分析可能です。
- ◆ PCR後の臭化エチジウムゲル検出の代替物として、良好な質量精度を有するMALDI-TOFMSが適用可能です。
- ◆ 教育研究室の学生に質量分析を紹介するのに有用な遺伝子型決定ワークフローです。

■はじめに

合成オリゴヌクレオチドは、DNA配列決定およびポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅で使用されるプライマーのように、分子生物学において様々な用途で用いられる短いDNAまたはRNA配列です。最近、合成オリゴヌクレオチドはバイオ医薬品の一つとして、いくつかの条件下で、治療、診断目的およびDNAに基づく診断テストキットのために探索されています。

嚢胞性線維症はDNAレベルで発症する病態の一例です(図1)。これは白人種の間で最も一般的な常染色体劣性疾患であり、染色体領域7q31.2に位置し、27個のエクソンを含む嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子 (CFTR) 遺伝子の変異に起因します¹⁾。CFTR遺伝子の突然変異は、塩素の輸送およびナトリウム取り込みの阻害を介して、気道および導管内の分泌物の水分補給の正常な維持を妨げます。これは主に気道上皮、汗腺、消化管 (膵臓と胆管系を含む)、および泌尿生殖器系などCFTRタンパク質が主に発現される領域で起こります¹⁾。

その臨床的関連に加え、嚢胞性線維症は教育研究室で遺伝子型決定ワークフローを示すのに有用と考えられます。なぜなら、複数の変異 (>1500)が同定されており¹⁾、これらは異なる分子アッセイが必要かもしれないからです。これら典型的なアッセイとしては、Phe508del、Gly542XおよびAsn1303Lys²⁾の突然変異に用いることができる amplification refractory mutation system (ARMS-PCR)、または、Arg1303Lys、Arg347Pro¹⁾、およびArg334Try³⁾の突然変異に使用できる restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)、さらにPhe508del、Ile507del、及び1677delTAに使用できるheteroduplex analysis (HA)³⁾などがあります。しかし、これらのアッセイではPCR増幅の後、生成物はゲル電気泳動によって検出されるのが一般的であり、UVボックス中の臭化エチジウム染色を用いて読み取られます^{1, 3)}。この場合、ワークフローは、労力と時間を要し、かつ高価になると考えられます。

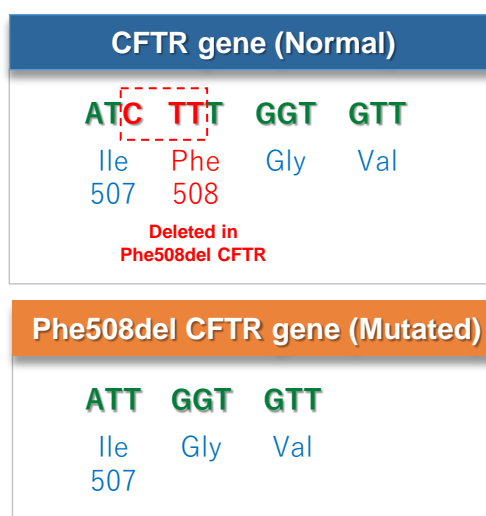


図1 嚢胞性線維症におけるCFTR遺伝子の最も一般的な変異 (Phe508del)の機構

MALDI-TOFMSは、オリゴヌクレオチドを分析するために広く使用されている確立された技術で、迅速で簡単であり、配列だけでなく分子的同一性に関する情報を提供できます。正イオンモードによるオリゴヌクレオチド分析の課題の1つは溶液中でのナトリウムまたはカリウム付加物の形成であり、このため、クリーンアップ工程が行われないと、感度およびピーク分解能の低下をもたらします。一方、負イオンモード分析では、塩付加物はほとんど検出されません。ここでは、卓上型両極性MALDI-8030 (図2)を用いて嚢胞性線維症 (Phe508del変異)の遺伝子型決定の適用例をご紹介します。塩付加物の干渉を除去し、試料調製と質量スペクトルの解釈を簡単にする負イオン化モードの利点を示します。このアプローチはPCR後に行うゲル電気泳動/臭化エチジウムの有用な代替法になると考えられます(図3)。

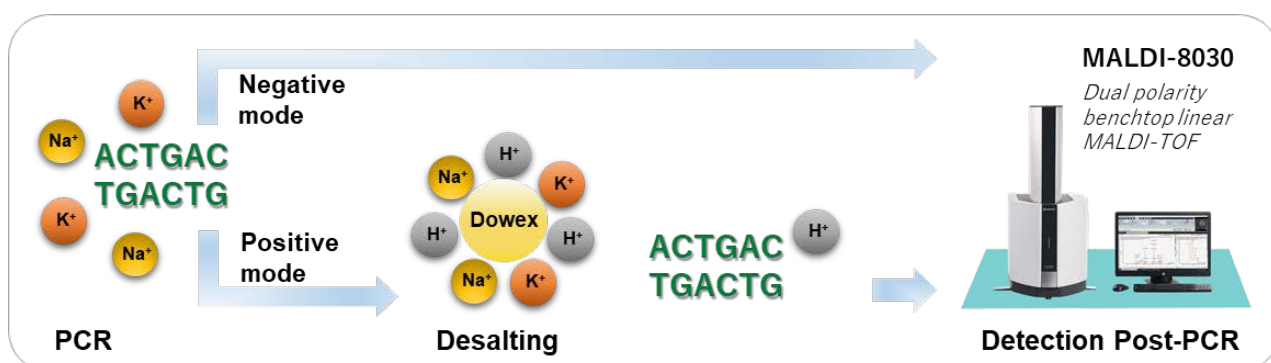


図2 合成オリゴヌクレオチドの分析ワークフロー

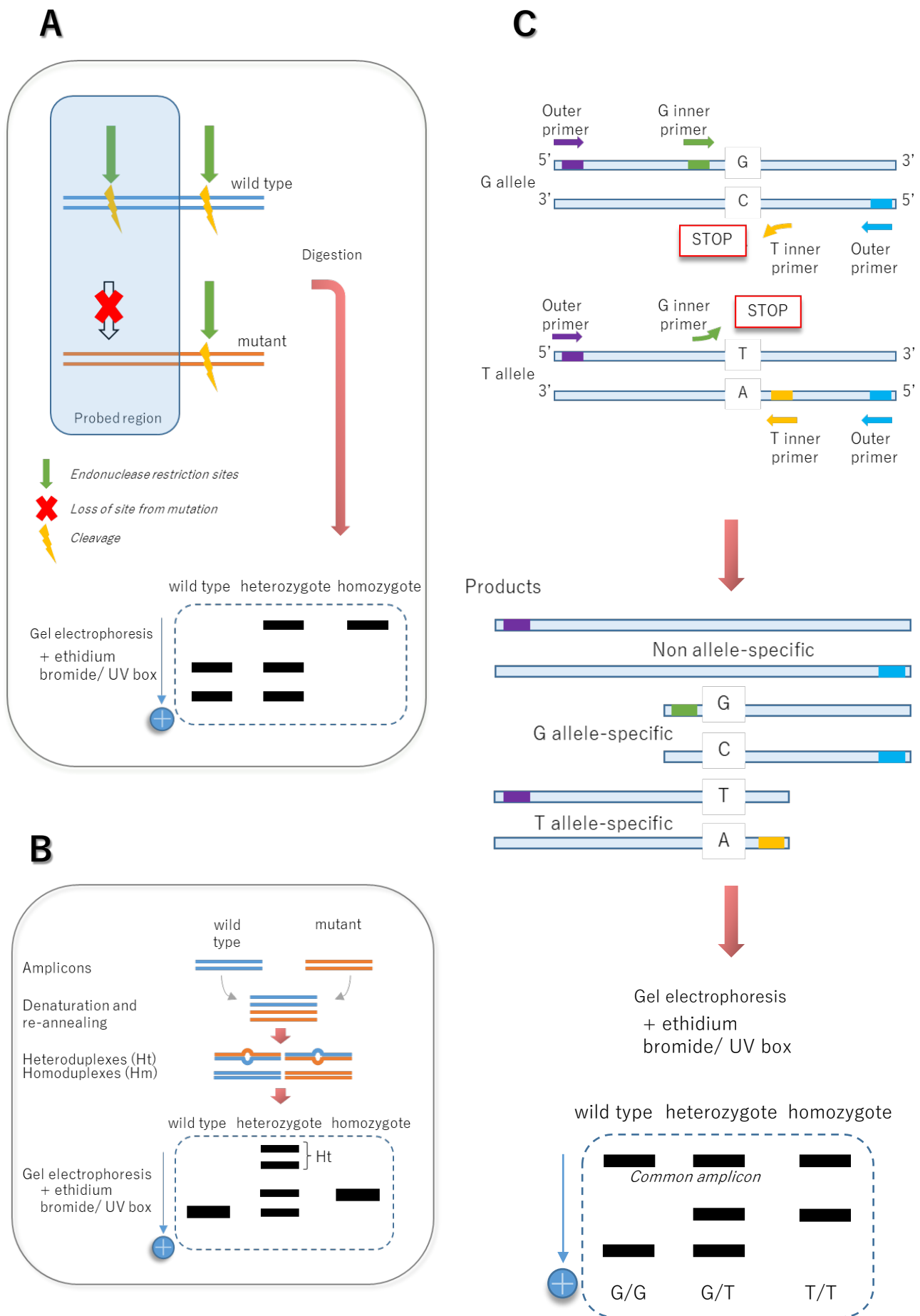


図 3 オリゴヌクレオチド生成物の検出がゲル電気泳動、臭化エチジウム/UVボックスを用いて行われるいくつかの一般的なPCR法
 A) 制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP); B) ヘテロ二本鎖PCR法; C) amplification refractory mutation system (ARMS-PCR)

*参考文献4)、5)、6)に基づくイメージ。

■分析条件と試料

一連の実験はPCR後にオリゴヌクレオチドが生成されたシナリオとしてシミュレートされました。この例では、嚢胞性線維症の対立遺伝子に基づいて実行されました。嚢胞性線維症を引き起こす突然変異が起こるCFTR遺伝子に対応する以下の合成オリゴヌクレオチドの試料は、メルクライフサイエンスから購入しました。

ATCTTTGGTGT (野生型/正常CFTR遺伝子)

ATTGGTGT (Phe508del CFTR変異遺伝子)

クエン酸アンモニウム (二塩基性)、Dowex イオン交換樹脂および3-Hydroxypicolinic acid (3-HPA) もメルクライフサイエンス社から購入しました。オリゴヌクレオチドをUHQ-水により100 μ Mで調製しました。クエン酸アンモニウムを70:30のアセトニトリル/水により5 mg/mLに調製し、これを用いて3-HPAマトリックス (45 mg/mL) を調製しました。

正イオンモードで測定する場合、試料の脱塩はDowex陽イオン交換樹脂により行いました。負イオンモード測定では脱塩は実施しませんでした。サンプルはMALDIターゲット上にスポットする前に、マトリックスと予め1:2の比率で混合しました。

MALDI分析は、脱塩及び非脱塩試料を用いてそれぞれ正及び負イオンモードでMALDI - 8030により実施しました。

■結果-嚢胞性線維症の遺伝子型判定 (合成オリゴヌクレオチド)

嚢胞性線維症の種々の遺伝子型を代表するオリゴヌクレオチドの負イオンモードスペクトルを示します (図4)。それぞれ、被験体が両親から正常なCFTR遺伝子を受け継いでいる野生型 (図4 A)、両親から変異型Phe508del CFTR遺伝子を受け継いでいるホモ接合体 (図4 B)、1つの正常CFTR遺伝子と1つのPhe508del CFTR変異遺伝子 (ヘテロ接合体) を受け継いでいる (図4 C)、を想定したデータです。

正確なm/z値は[M-H]のaverage massとして以下の様に計算しました。

- 正常CFTR遺伝子
ATCTTTGGTGT : m/z 3656.43
- Phe508del, CFTR変異遺伝子
ATTGGTGT : m/z 2758.85

図4に示されるように、すべてのオリゴヌクレオチド種を良好な質量精度で検出しました。

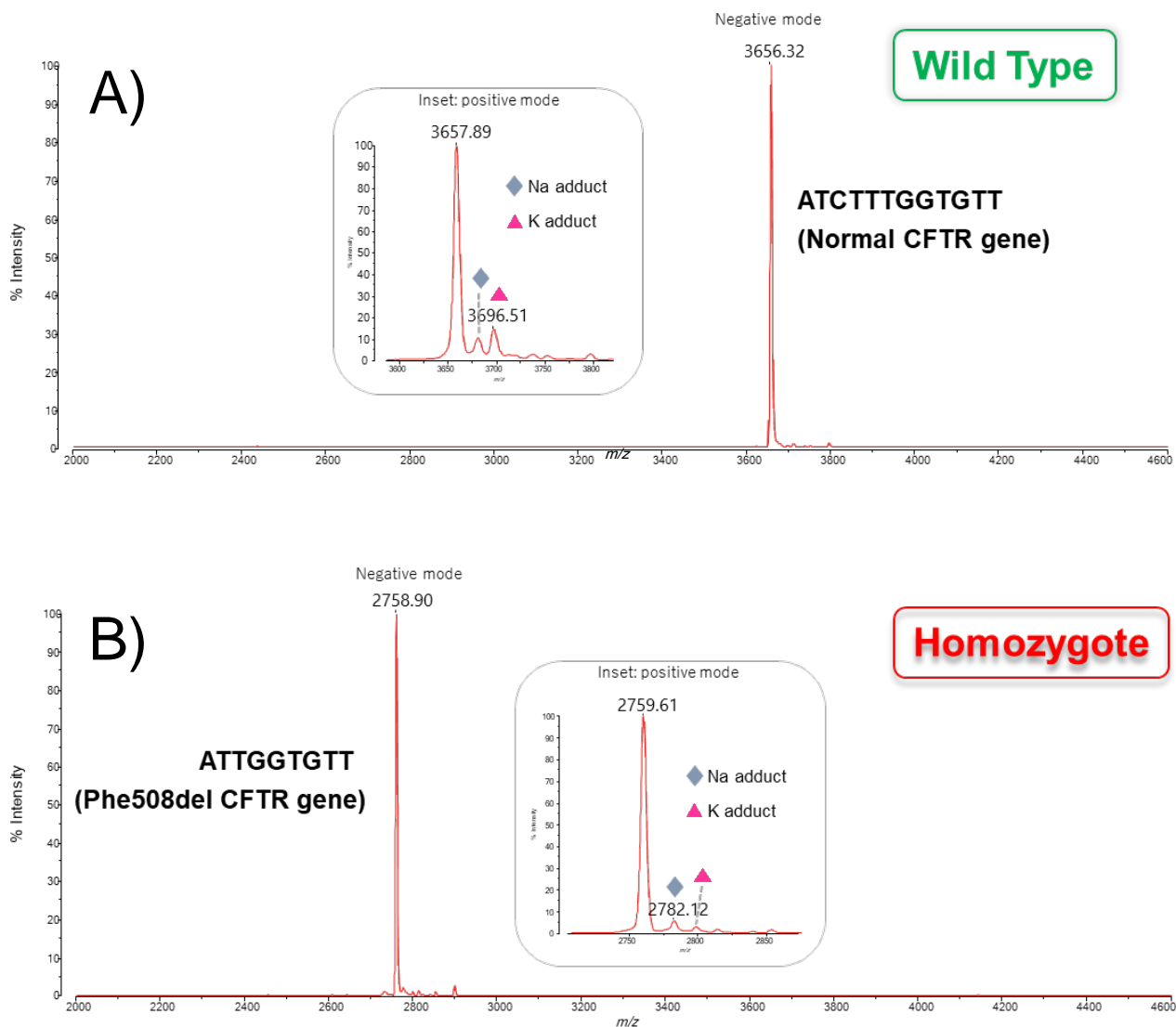


図4 (次ページに続く) 嚢胞性線維症の3つの異なる遺伝子型を表すオリゴヌクレオチドの負イオンモードのマススペクトル
 A) 正常CFTR遺伝子のみ(野生型)、B) Phe508 del CFTR変異遺伝子のみ(ホモ接合体)
 *挿入図は、正イオンモード分析で得られたオリゴヌクレオチドピークを示す。

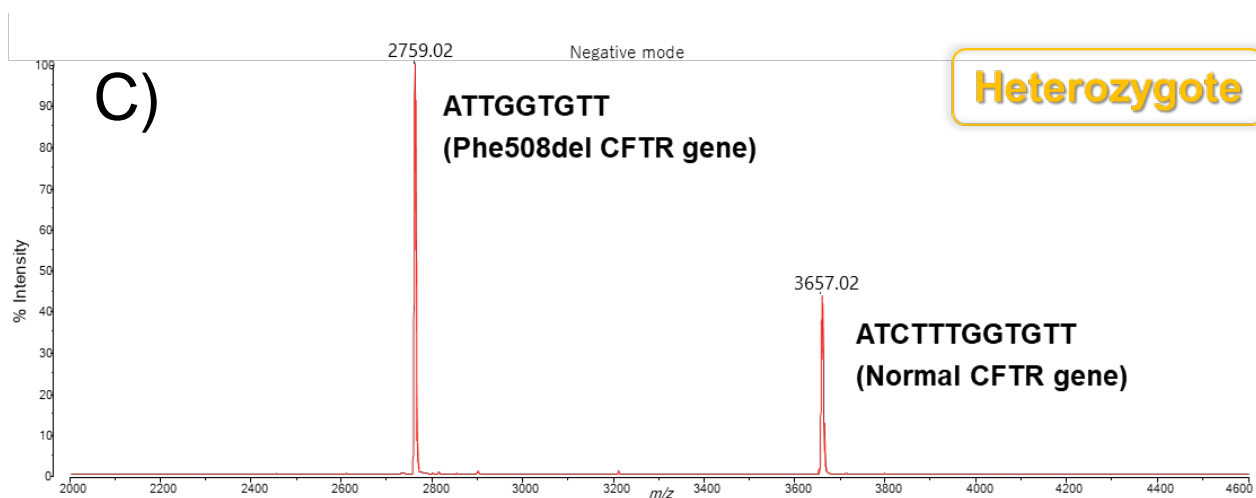


図 4 (前ページからの続き) 嚢胞性線維症の3つの異なる遺伝子型を表すオリゴヌクレオチドの負イオンモードのマスマスペクトル C) 1つの正常なCFTR遺伝子と1つのPhe508del CFTR変異遺伝子から成るヘテロ接合体 (疾患のキャリアを示す)

図 4 のA)およびB)の挿入図は、正イオンモード分析で得られたオリゴヌクレオチドピークを示します。これらスペクトル中に見られるように、脱塩 (陽イオン交換) を行っても、少量のナトリウムおよびカリウム付加体が検出されます。これに対して、負イオンモードで得られたスペクトルは、塩付加物を含まず分子関連イオンが明瞭に認識できることから、脱塩は必要ないと考えられます。

また、図 4 A)~C)の強いシグナルで見られるように、オリゴヌクレオチドの検出がMALDI-TOFMSを用いて良好に行われたことを示しています。本実験に用いた装置の性能は正常なCFTRオリゴヌクレオチドとヘテロ接合体におけるPhe508del CFTR変異オリゴヌクレオチドの分離を可能にし (図 4 C)、したがって野生型、ホモ接合体およびヘテロ接合体に由来する3種類の産生物から全ての遺伝子型決定が容易に可能です。

■まとめ

本アプリケーションは、卓上型両極性装置、MALDI-8030 が合成オリゴヌクレオチドを容易に検出し、かつ質量分離する能力を示しました。

オリゴヌクレオチドの分析において試料の脱塩というクリーンアップ段階を排除するための負イオンモード検出の利点を、良好なシグナル強度と共に示しました。

ここに示した全体的な分析ワークフローは単純であり、ゲル電気泳動を介して実行する場合よりも高速と考えられます。したがって、この技術は、PCR増幅後の教育実習セッションにおいて学生を訓練するのに有用である可能性があり、また、遺伝子型決定のためのよりルーチンな実習室においても有用と思われる。

■参考文献

- 1) Hakkak, Atieh Mehdizadeh, et al. "Analysis of CFTR gene mutations in children with cystic fibrosis, first report from North-East of Iran." *Iranian journal of basic medical sciences* 16.8 (2013): 917.
- 2) Ferrie, Richard M., et al. "Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene." *American journal of human genetics* 51.2 (1992): 251.
- 3) Frențescu, Lucian, et al. "The study of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations in a group of patients from Romania." *Journal of Cystic Fibrosis* 7.5 (2008): 423-428.
- 4) "Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)". Ncbi.Nlm.Nih.Gov,2021,https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techrf1p/. Accessed 7 Jan 2021.
- 5) Srinivasan, Srilakshmi, and Jyotsna Batra. "Single Nucleotide Polymorphism Typing." (2019): 432-440.
- 6) Peng, Bao-yu, et al. "A novel and quick PCR-based method to genotype mice with a leptin receptor mutation (db/db mice)." *Acta Pharmacologica Sinica* 39.1 (2018): 117-123.