

Application News

No. B65

マイクロチップ電気泳動

MultiNA によるヘテロ二本鎖移動度分析 (HMA:Heteroduplex Mobility Assay)

はじめに

TAL effector nuclease (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) や CRISPR/CAS9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated Proteins 9) によるゲノム編集ツールの登場によって、標的遺伝子に対して、特異的に破壊を加えたり、遺伝子を導入することが可能になりました。

微生物、動物、植物など、これまでに遺伝子改変が困難であった生物にも適用が可能になってきたことから、急速に普及しています。

標的部位における変異導入の有無についての評価には、直接配列を解析する方法や二本鎖中のミスマッチを認識して切断する酵素を利用する方法がありますが、いずれも費用と労力を要します。

HMA (ヘテロ二本鎖移動度分析) は簡便、迅速、安価に実施できる方法です (図 1)。通常の電気泳動において、DNA は完全相補的なホモ二本鎖であり、その移動度は分子量 (サイズ) に依存します。一方、二本鎖のうちどちらか片方の一部に変異がある DNA は、ミスマッチ部分が相補鎖を形成しておらずヘテロ二本鎖 DNA となっています。ヘテロ二本鎖 DNA のミスマッチ部分はホモ二本鎖 DNA とは立体構造が異なっています。そのためヘテロ二本鎖 DNA は電気泳動における移動度が遅くなる傾向にあります。HMA はこの現象を利用して電気泳動による変異の有無と遺伝子型を判定することができます。

本アプリケーションでは、モデル DNA による HMA の検出を DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA での分析例をご紹介します。

Sogabe

標準試料の準備

分析には 110 bp を基準として、2 塩基欠させた 108 bp、5 塩基欠させた 105 bp のモデル DNA を作製しました。それぞれをプラスミドに挿入したものを PCR の鋳型として用いました。各モデル DNA の塩基配列は下記のとおりです。「*」は欠失を示しています。

>モデル DNA110 bp
ACACAAGTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGA
GAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTG

>モデル DNA108 bp
ACACAAGTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCC*AGGA
GAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTG

>モデル DNA105 bp
ACACAAGTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTC****GAG
AAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTG

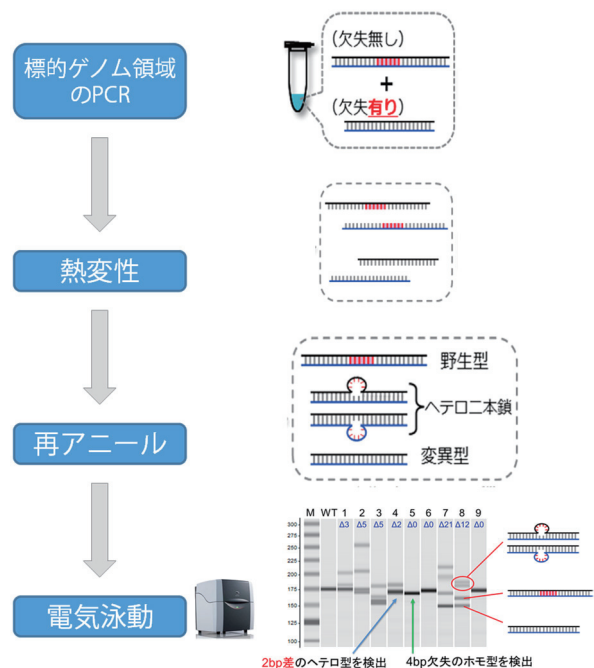


図 1 HMA の流れ

方法

・反応液	
Sample	0.5 μL
2xBuffer	5.0 μL
dNTPs (2 mM)	1.0 μL
Primer F (2 μM)	1.0 μL
Primer R (2 μM)	1.0 μL
DW	1.4 μL
KOD FX	0.1 μL
Total	10.0 μL

・PCRサイクル	
98 °C	1 min
98 °C	10 sec
60 °C	15 sec
68 °C	15 sec
68 °C	7 min
4 °C	∞

} x30 cycles

●ヘテロ二本鎖形成

前頁の条件で反応したPCR産物を110 bp-108 bp、110 bp-105 bp、108 bp-105 bpの組み合わせでそれぞれ1:1で混合しました。混合したものを95℃で5分の変性後、0.1℃/secで5℃まで冷却し、ヘテロ二本鎖を形成させました。

●電気泳動

PCR産物とヘテロ二本鎖形成させたサンプルをマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA で分析しました。分析は蛍光色素にSYBR Gold、分離バッファには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2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。ゲルイメージの左から3つが110 bp、108 bp、105 bpのPCR産物の分析結果です。左から4つ目以降が110-108 bp、110-105 bp、108-105 bpのHMAの分析結果です。

ヘテロ二本鎖を形成させた110-108 bp、110-105 bpおよび108-105 bpのHMAではそれぞれ複数のバンドが検出されました。

高分子側のバンド(図2の赤囲み)はヘテロ二本鎖のバンドに相当します。ミスマッチの塩基数が多いほどヘテロ二本鎖のバンドは高分子側に検出される傾向を確認できました。

特に、110-108 bpのHMAの結果では、低分子側のバンドは108 bpと110 bpの混合物によるバンドであり、高分子側のバンドはヘテロ二本鎖のバンドに相当します。このように、MultiNAでは2 bp 差のヘテロ二本鎖を分離することができました。

MultiNAは電気泳動の結果をエレクトロフェログラム(波形データ)としてデータを取得します。データ閲覧ソフト(MultiNA Viewer)の機能により各サンプルのエレクトロフェログラムを選択し、重ね合わせて表示させることが可能です。図3はHMAの組み合わせに使用した2つのPCR産物とHMAの分析結果を比較したエレクトロフェログラムです。

MultiNAはアガロースゲル電気泳動と比較して、分離度、再現性に優れており、HMAサンプル中のホモ二本鎖とそれぞれのPCR産物のピークが合致しています。

また、エレクトロフェログラムではピークの面積から自動でモル濃度が算出されます。この機能を利用してヘテロ二本鎖とホモ二本鎖のモル濃度を比較することでゲノム編集における各個体の変異率を簡易に得ることも可能です。

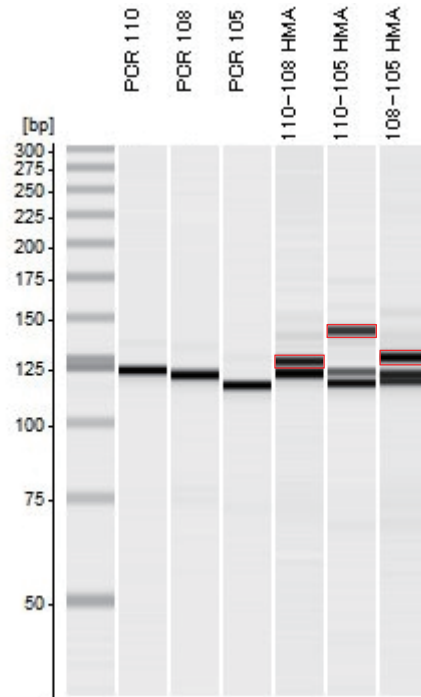


図2 MultiNAによるPCR産物とHMAのゲルイメージ

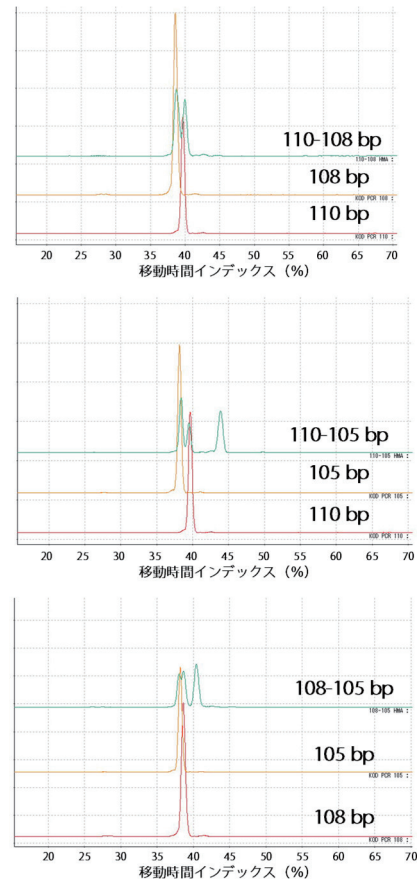


図3 PCR産物とHMAの移動度の比較(エレクトロフェログラム)