

PCRダイレクトシーケンスにおけるMultiNAの有用性

Utility of MultiNA in PCR Direct Sequencing

PCRダイレクトシーケンスは、PCR反応後の増幅産物をクローニングを行うことなく、直接鋳型として塩基配列を決定する方法です。この方法はクローニングベクターにPCR産物をクローニングする手間がないこと、クローニング後の塩基取込間違いによる影響が低いことなどから、早期に塩基配列情報を得るために非常に有効な手段です。

しかしながら、PCR後の増幅状況によりその結果が大きく左右されます。その成功率を高めるためにはシーケンス反応前にPCR産物の純度（質と量）を確認しておく必要があります。その確認には従来アガロースゲル電気泳動法が多く用いられてきました。

しかしながら、一見、目的PCR産物が単一であると確認

できているにもかかわらずシーケンス分析では複数のサンプルが混在したようなシーケンスデータだったということがあります。その原因の一つとして考えられているのがアガロースゲル電気泳動の感度の限界です。この方法では微量に含まれているPCRの副反応物の存在を明らかにすることが困難です。

ここでは、岡山県農林水産総合センター生物科学研究所にてアブラナ科植物のハウスキーピング遺伝子探索の際に行ったPCRダイレクトシーケンスにおけるPCR産物の純度検定をご紹介します。

Y. Sogabe

■分析手順

Experimental Procedure

サンプルはコマツナ；おそめ (Osome)， ナタネ；Westarのハウスキーピング遺伝子の探索で行ったPCR増幅産物2点を用いました。

PCR反応後の増幅産物をマイクロチップ電気泳動装置にて純度検定を行いました。また、同じサンプルを従来法であるアガロースゲル電気泳動でも行い、分析結果の比較を行いました。アガロースゲルは1.0 %の濃度のものを用いました。

2つのPCR産物はダイレクトシーケンスにて塩基配列解析を行いました。

■試薬/キット

Reagents / Kits

- DNA-2500kit
(島津製作所) P/N292-27912-91
- SYBR® Gold nucleic acid gel stain
(インビトロジェン) S11494
- pGEM DNAマーカ
(プロメガ) G1741

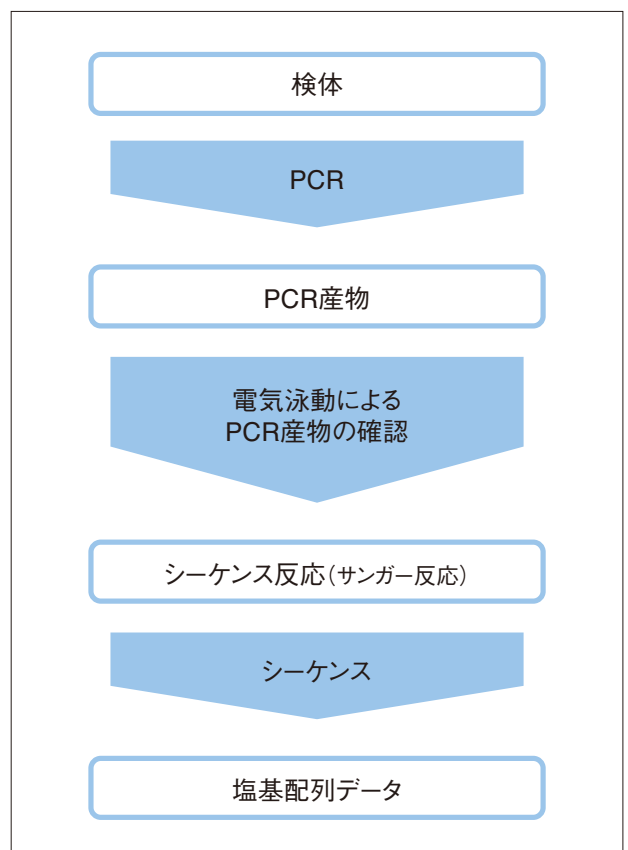


Fig. 1 PCRダイレクトシーケンスの手順
Experimental Procedure of PCR Direct Sequencing

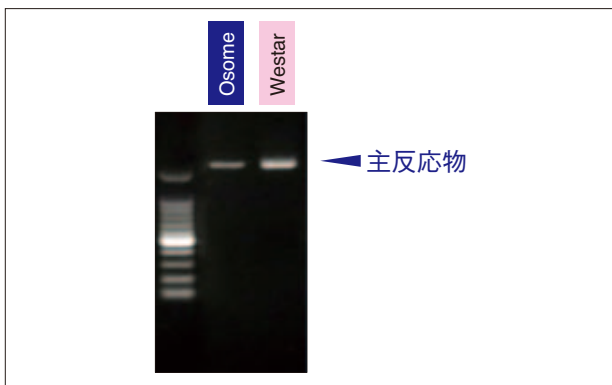
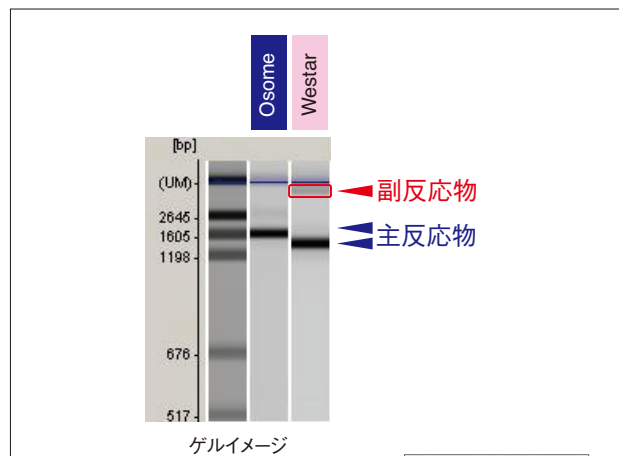
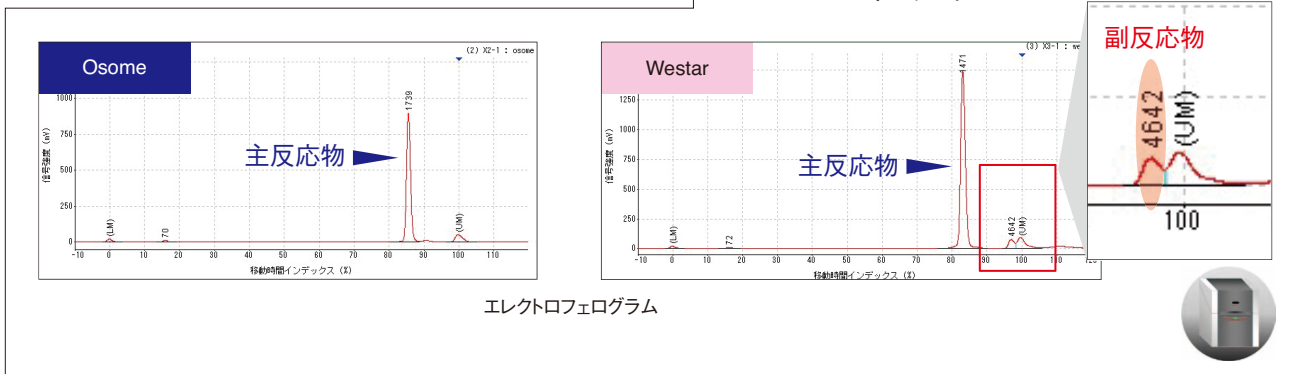


Fig. 2 PCR産物のアガロースゲル電気泳動結果
Result of PCR Products by Agarose Gel Electrophoresis



ゲルイメージ



エレクトロフェログラム

Fig. 3 PCR産物のMultiNAによる電気泳動結果
Analytical Results of PCR Products by MultiNA

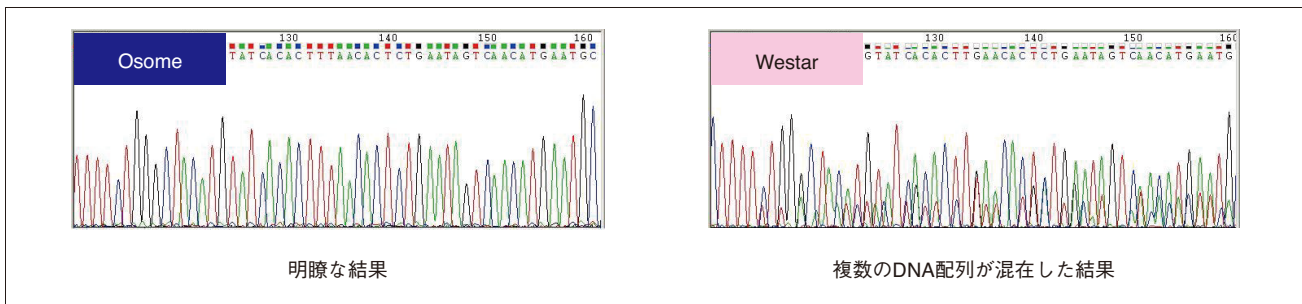


Fig. 4 PCR産物のダイレクトシーケンス結果
Direct Sequencing Results of PCR Products

結果 Results

それぞれのPCR産物はサイズが異なるにも関わらずアガロースゲル電気泳動ではほぼ同じサイズで検出されました (Fig. 2)。

MultiNAによる電気泳動結果 (Fig. 3) ではサンプル Westarで副反応物が検出されました。ゲルイメージでは薄く確認できますが、エレクトロフェログラムではDNAがはっきりとピークとして検出されているのを確認できました。しかしながら、アガロースゲル電気泳動ではこれら副反応物は検出されませんでした。

OsomeとWestarをシーケンス分析したところ副反応物のな

いOsomeはきれいなシーケンスデータを得ることができました。一方MultiNAで副反応物が確認されたWestarは複数のDNA配列の混在したシーケンス結果となりました (Fig. 4)。

以上の結果からMultiNAではアガロースゲル電気泳動よりも検出感度が高いのでPCRにおける微量の副反応物を検出することができました。MultiNAではエレクトロフェログラムのピーク面積から濃度算出することができます。この値はシーケンス反応に用いるには十分許容されるレベルです。従いまして、PCRダイレクトシーケンスにおけるPCR産物の純度検定にMultiNAは非常に有効です。

※サンプルおよびデータご提供先
岡山県農林水産総合センター生物科学研究所 (RIBS) 植物免疫研究グループグループリーダー 鳴坂義弘先生、鳴坂真理先生

初版発行：2011年7月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津コールセンター

☎0120-131691
TEL: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。