

Application Note

No.40

ライフサイエンス

Ampdirect® 技術とリアルタイム PCR 装置による簡便・迅速なジェノタイピング法 – Ampdirect® Plus の活用 –

Rapid and Simple Genotyping Method Using Real-time PCR Devise with Ampdirect® Technology – Application of Ampdirect® Plus –

日野 純^{*1}, 宮里幹也^{*1}



Lifescience

1. はじめに

近年、ライフサイエンス分野の研究における遺伝子改変マウスの利用は、急激に増加し、もはや特別な手法ではなく、むしろ誰でも容易に入手し、取り扱える必須のツールの一つとなってきています。

実験に遺伝子改変マウスを使用する場合は、それを繁殖する必要がありますが、ほとんどの場合は、その際、ジェノタイピングと呼ばれる方法により、遺伝子改変マウスの型（遺伝子型）を判別しています。例えば、ノックアウトマウスであれば、ホモノックアウトマウス、ヘテロノックアウトマウス、野生型マウスを、また、トランスジェニックマウス (Tg) であれば、Tg と non-Tg とを判別します。ジェノタイピングの

方法については、遺伝子改変マウスの開発当初は、サザンブロットリング法が用いられてきましたが、現在では、それは、作製の初期段階での使用に限られ、系統のライン化後の世代からは、ほとんど PCR 法が用いられています。PCR 法についても、当初は、マウス尻尾の抽出物を Proteinase K 処理後、DNA を精製してから PCR という手順が一般的でした。¹⁾

しかし、冒頭に記しましたように、遺伝子改変マウスを用いた研究は一般化したことで、ジェノタイピング自体はルーチン化し、時間面、コスト面からも効率化が求められ、最近では、効率化を目指した方法として、未精製 DNA を直接 PCR する方法が広まってきています。

*1 国立研究開発法人 国立循環器病研究センター 研究所生化学部

2. Ampdirect® 技術とリアルタイム PCR 装置を組み合わせたジェノタイピング法

Ampdirect® Plus は、未精製 DNA（組織抽出物等）を直接 PCR 解析できる試薬であり、遺伝子改変マウスのジェノタイピングに広く使用されています。実際に、マウス尻尾抽出液を直接 PCR した例が数多く報告されています。²⁾

今回は、私達がルーチンワークの一つとして行っている Ampdirect® 技術とリアルタイム PCR 装置を組み合わせた、簡便・迅速なジェノタイピングの方法をご紹介します。方法を、従来法と比較して示しました（図 1）。

従来法、本法共に、同様の方法にて、マウスの尻尾を抽出、proteinase K 処理を行い、その未精製 DNA 抽出物を PCR 反応に供します。従来法では、通常型 PCR 装置にて反応を行い、アガロース電気泳動により PCR 産物を解析し、ジェノタイピングを行います。一方、本法では、これら一連の操作（PCR 反応および解析）をリアルタイム PCR 装置にて行います。すなわち、本法では、従来法のアガロースゲル等による電気泳動による解析を省略し、解析も同一の装置にて行うことで、簡便、迅速な判定を実現しました。実際の私達のジェノタイピングの場合（50 匹前後）、マウスの尻尾のサンプリングから遺伝子型の判定まで、従来法ですと約 2 日間が必要でしたが、本法を用いることで、1 日で終了することが可

能となりました。本法は 96 穴プレート（384 穴プレートへの応用も可能）での PCR 反応ですので、サンプル数が多い場合は、特にその優れた威力を発揮します。また、従来法での PCR から電気泳動の際には、PCR 産物を一サンプルずつアガロースゲルに供する必要があるため、その過程での人為的な誤りに起因する判定間違いが発生し、研究推進の遅れを招くことにも繋がり問題となっていました。本法では、その過程を省略できるため、そこでの誤りを排除し、その結果、正確性も向上することになります。電気泳動による PCR 産物の解析では、エチジウムブロマイドによる DNA 染色法が用いられることが一般的です。しかし、エチジウムブロマイドの発がん性の為、泳動バッファーやアガロースゲルの作製から廃棄までの一連の操作は、一般的な生化学試薬の調製と比較して煩雑な作業となります。そのため、環境面、操作面からも電気泳動を省略している本法が、優れた方法であることがわかります。本法で新たに準備する試薬は、SYBR Green のみで、これは、広く一般化している市販の SYBR Green 原液（code: 5761, TaKaRa 等）を 10,000 倍希釈（最終濃度）で使用しますので、コスト面での負担の増加を考慮する必要はありません。

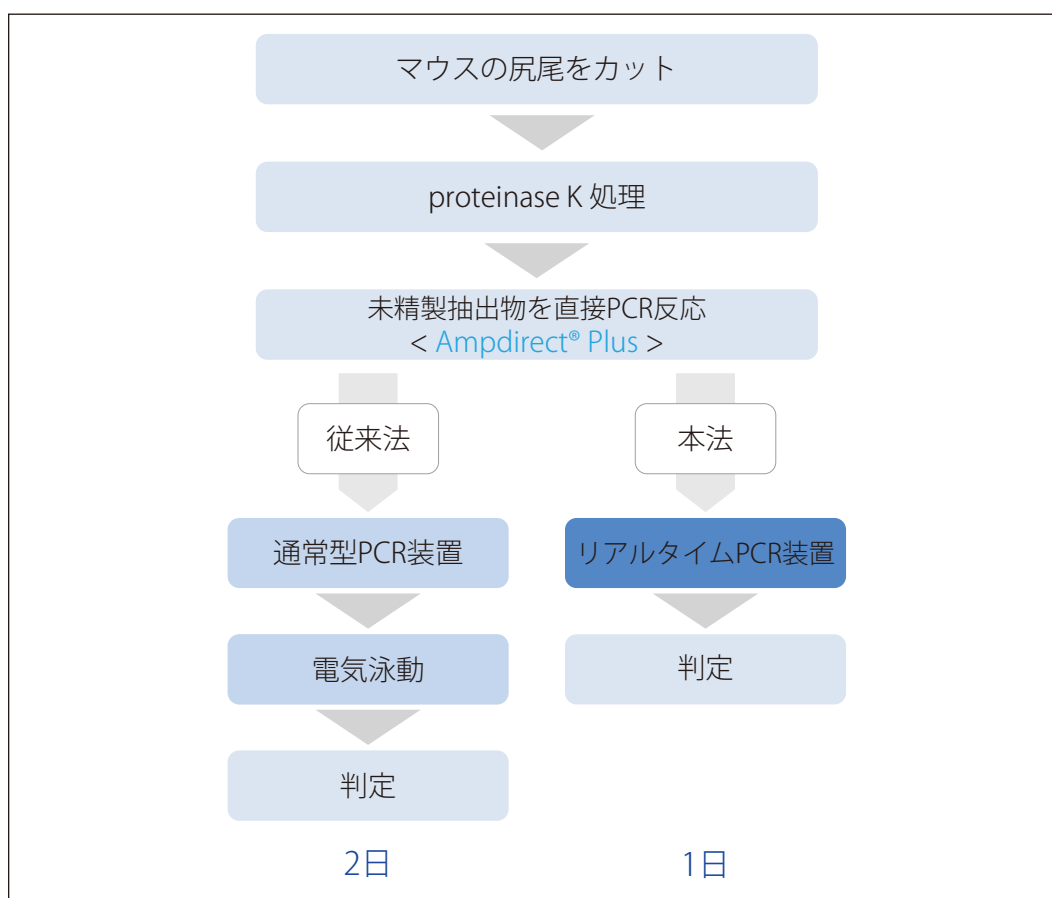


図1 ジェノタイピングの方法の比較

3. 本法によるトランスジェニックマウスのジェノタイプング

本法による Tg と non-Tg の解析結果を従来法であるアガロースゲル電気泳動の結果と共に図 2 に示します。

方法は前頁に従って行いました。すなわち、マウスの尻尾をカット (5 mm 程度) し、それに proteinase K (20 mg/mL) を含む抽出バッファー 400 μ L (Tris 緩衝溶液, pH 8.0) を加え、65 $^{\circ}$ C で 2 時間、攪拌しながら抽出、溶解を行いました。その後、proteinase K を失活させる為、95 $^{\circ}$ C、10 分加熱し、この未精製抽出物、0.5 μ L を直接 PCR 反応に供しました。反応液は、20 μ L の系で、バッファーとして Ampdirect[®] Plus (Shimadzu)、SYBR Green I (最終 10,000 倍希釈)、0.5 μ M プライマー、BIOTAQ HS DNA Polymerase (0.5 U) を加えました。反応条件は、95 $^{\circ}$ C、10 分後、95 $^{\circ}$ C、10 秒、60 $^{\circ}$ C、10 秒、72 $^{\circ}$ C、10 秒のサイクルを 35 回行いました。反応終了後に、融解曲線解析は、65 $^{\circ}$ C から 97 $^{\circ}$ C まで、0.11 $^{\circ}$ C/秒で温度を上昇させました。定量的な解析を、(1) の増幅曲線にて、定性的な解析を (2) の融解曲線にて行っています。

増幅曲線では、Tg サンプルだけが 22 サイクル辺りから蛍光強度が急激に増加していることが判ります。他方、non-Tg とネガティブコントロール (H₂O) では、全く増幅されずフラットな蛍光パターンを示しました。この結果より、本法により、Tg と non-Tg を明確に区別できることを証明しました。

融解曲線において、Tg は、86 $^{\circ}$ C 付近にシャープな一本のピークを示していることから、1 つの PCR 産物のみが増幅していることが判ります。non-Tg、ネガティブコントロールでは、いずれにおいてもピークは認められませんでした。

本法の検討を始めた当初、私達が懸念したのは、リアルタイム PCR 装置の本来の機能、高感度・高精度の定量性の為、従来法のアガロースゲルでの解析では検出されない低濃度あるいは幅広い DNA 長の範囲に薄く検出される多数の PCR 産物の集合体等 (いわゆるスメアバンド) が検出されてしまい、その結果、増幅はするものの、融解曲線にて複数のピークが検出され、目的の PCR 産物の増幅の判定が困難になる可能性でした。ところが、実際には下図の融解曲線に示したように、きれいなシングルピークが検出され、明確に Tg と non-Tg を区別できることが判りました。この成功は、未精製抽出物の PCR に特化した Ampdirect[®] Plus を用いた反応系であることが重要な要素の一つと考えられます。

図 2 (3) は、同じプライマーセットを用いたアガロースゲル電気泳動 (従来法) における結果を示します。PCR 反応液は、SYBR Green I を除き、前述と同じです。反応条件は、95 $^{\circ}$ C、10 分後、94 $^{\circ}$ C、30 秒、60 $^{\circ}$ C、1 分、72 $^{\circ}$ C、1 分のサイクルを 35 回行いました。反応液 10 μ L を 2% アガロースゲルにて泳動し、エチジウムブロマイド染色し、UV 光により PCR 産物を可視化し検出しました。Tg のトランスジェニックの配列から予想される約 100 bp のバンドが検出され、non-Tg、negative コントロール (H₂O) では、バンドは検出されず、リアルタイム PCR による本法と従来法の結果が一致していることが確認できました。

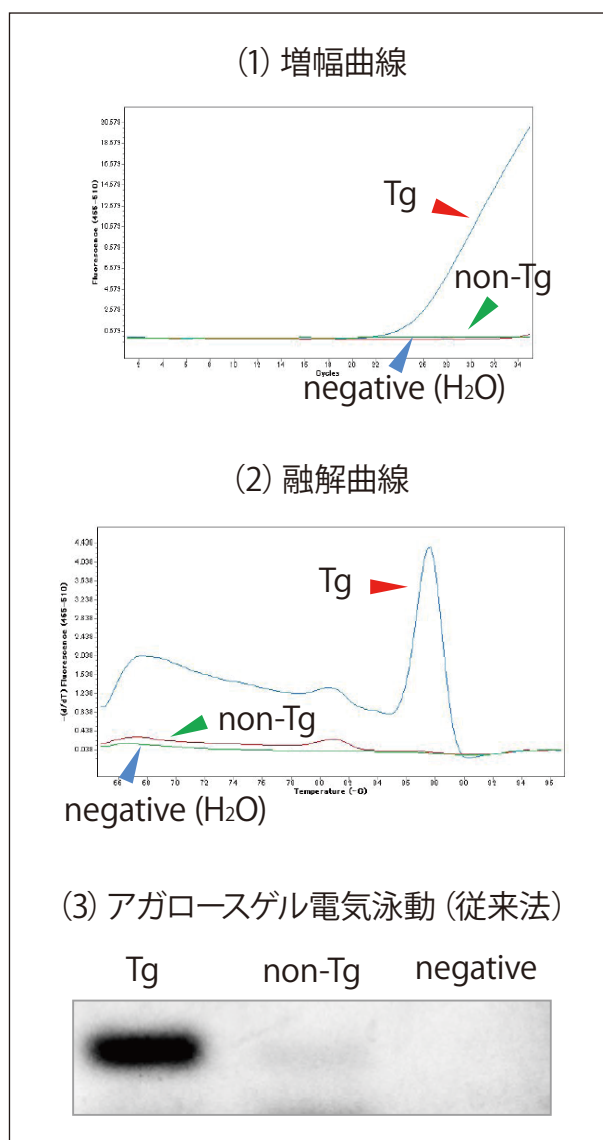


図 2 従来法との結果の比較

4. 本法によるトランスジェニックマウスのジェノタイピングの実施例

図3には、トランスジェニックマウス (POSTN-CNP Tg^{*}) のジェノタイピングの実施例 (10匹) を示しました。³⁾ PCR 反応液調製までの操作は前述の方法と同様に行いました。PCR の反応から融解曲線解析までは、同一サンプルを2種類のリアルタイムPCR装置 (GVP-9600 (Shimadzu) と他社製品) を用いて解析しました。PCR 反応および融解曲線は、前頁に記した条件で行いました。

(1) の増幅曲線では、両機種ともに増幅するサンプル (Tg, 5匹) と増幅しないサンプル (non-Tg, 5匹) を明確に区別できました。また、(2) の融解曲線では、両機種ともに 86 °C 付近にシャープなピークが示され、目的とする一つのPCR産物のみが増幅されていることも確認できました。両機種における解析結果 (増幅曲線と融解曲線) から、Tg と non-Tg を明確に判別することができました。

以上の結果は装置に依存することなく、判別が可能であること、すなわち本法の汎用性も示すことができました。

今回は、1種類のジェノタイピングの実施例のみを紹介しま

※ ベリオスチンプロモーター (線維芽細胞特異的) によるC型ナトリウム利尿ペプチド過剰発現マウス

したが、私達はその他の多量のジェノタイピングでも全く同様の結果を得ています。実際に、私達は本法をルーチン化して活用しており、これまでに数千匹レベルでのジェノタイピングを行っておりますが、予想外なトラブルや間違いはなく、上述 (セクション2) に記した簡便性、迅速性、正確性をより確実なものとして実感しているところです。本法を日常的に用いている現在、改めて従来法と比較すると、本法の大きな利点は電気泳動を省略していることで、それに関わる一連の作業 (アガロースゲル、泳動バッファーの作製、泳動、ゲル撮影装置によるPCR産物の検出) 無しに、PCR反応から検出までを一つの機器にて完結できることと感じています。今後は、更に種類や系統のバリエーションを増やして、例えばダブル、トリプルノックアウトマウスやトランスジェニックマウス等、本法によるジェノタイピング法をより一般化するとともに、ジェノタイピング以外にも、本法の簡便性を活かし、SNP解析や遺伝子検査等への応用も考えていきたいと思っています。

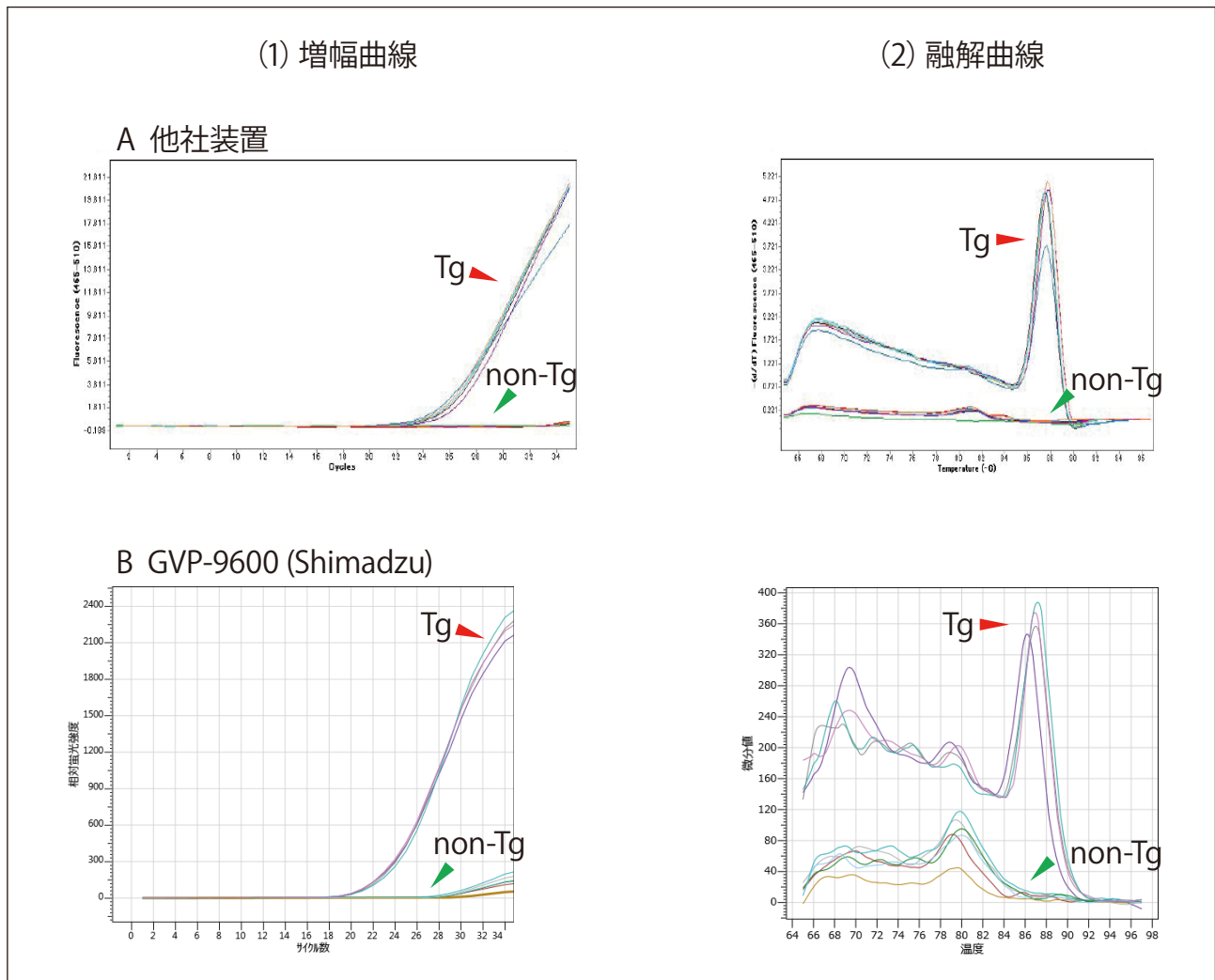


図3 Tg と non-Tg の判別実施例

5. まとめ

リアルタイム PCR 装置を利用することで、Ampdirect® 技術を用いた未精製 DNA のジェノタイピングを簡便、迅速化することができました。今回は、Tg のジェノタイピングの例だけを示しましたが、本法はあらゆる遺伝子改変マウスのジェノタイピングに応用が可能です。実際、私達は、3 種類のトランスジェニックマウスに加え、ダブルトランスジェニックマウスや一塩基置換の遺伝子改変マウスのジェノタイピングに、本法をルーチン化して活用しています。

本法においては、Ampdirect® Plus による未精製 DNA の PCR の精度や安定性が重要です。一方で、本法の解析に用いるリアルタイム PCR 装置は、近年では、研究室の標準機器として一般化してきました。従来、リアルタイム PCR 装置は、精製した試料の高精度・高感度な定量性を重視した定量 PCR 解析に用いられてきましたが、それに対して、本法では、未精製の試料（尻尾の抽出物等）を直接分析という簡便性に力点を置いた定性的解析に用いられており、リアルタイム PCR 装置の新しい実践的な応用性も示しました。これらのことから、今後、本法が、新しいジェノタイピング法として広く一般化することが期待されます。

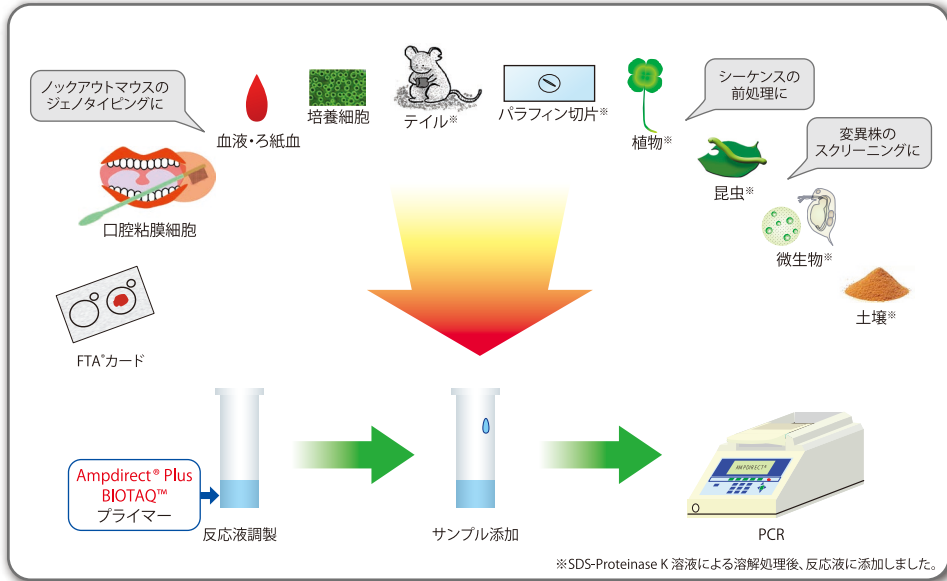
引用文献

- 1) Alexandra L. Joyner 著, 野田哲生 監訳, ジーン ターゲティング, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 1995年12月
- 2) Ampdirect® Plus のカタログ, <http://www.an.shimadzu.co.jp/bio/reagents/amp/index.htm>
- 3) Kimura T, Nojiri T, Hino J, Hosoda H, Miura K, Shintani Y, Inoue M, Zenitani M, Takabatake H, Miyazato M, Okumura M, Kangawa K. C-type natriuretic peptide ameliorates pulmonary fibrosis by acting on lung fibroblasts in mice. *Respir Res.* 17, 19, 2016

DNA精製はもう不要です!

Ampdirect® Plus 酵素セット

ノックアウトマウスのジェノタイピングや植物DNAマーカの検出他、PCR操作を負担に感じることはありませんか? DNA精製不要のPCR試薬、Ampdirect® Plus酵素セットは、皆様のご負担を劇的に軽減いたします。この機会にぜひお試しください。



■ 簡便・迅速

DNA精製が不要になり、簡便かつ迅速なPCRが可能になります。

■ ホットスタート用酵素

便利で高性能なホットスタート用Taq Polymeraseを採用しております。

■ 微量サンプルに最適

DNA精製が不要なため、精製時のサンプルロスがなく、微量サンプルからのPCRに最適です。

■ シーケンス、フラグメント解析に

増幅産物は、シーケンスやRFLPなどのフラグメント解析に使用可能です。

■ 安定したPCRに

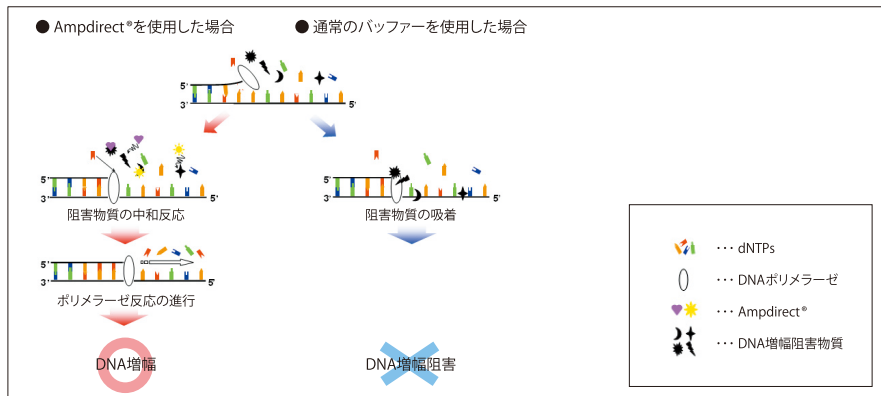
サンプル中の夾雑物によるPCR阻害を受けにくくなり、安定したPCRが可能になります。

■ 低コスト

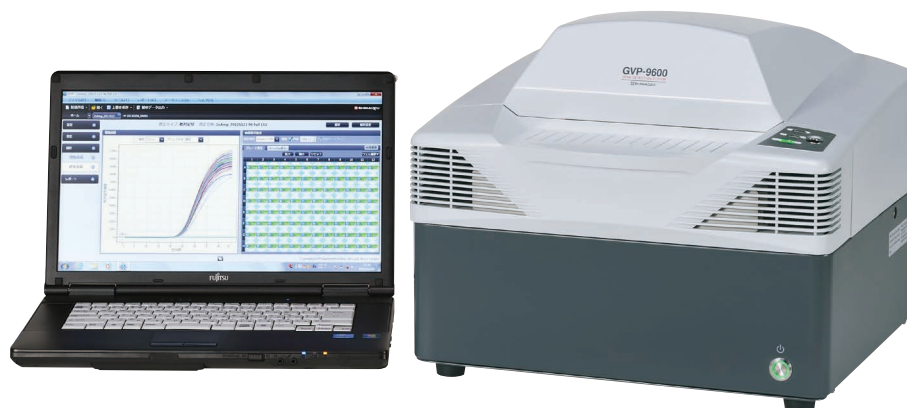
DNA抽出キットや装置は不要となり、ランニングコストを抑えることが可能となります。

Ampdirect® の原理

Ampdirect®はサンプル中のタンパク質や糖といったPCR阻害物質に対する中和作用をもつため、DNA精製なしにサンプルから直接PCRやクールドな状態からのPCRが可能になります。



遺伝子検査装置 “ GVP-9600 ”



短時間で測定

- ・ 温調ブロックの昇降温速度は 4.0 °C/秒 (最大) です。
- ・ 96 ウェル全体の光学スキャンは 7 秒^{※1} で完了します。

低コストで運用

- ・ 市販の透明 (クリア) タイプのチューブやプレートが使用できます^{※2}。
- ・ 光源に LED を採用し、ハロゲンランプのように定期的な交換は必要ありません。

充実のソフトウェア機能で確かな解析

- ・ 最適な温調アルゴリズムにより、反応ボリュームは 100 μ L まで対応しています。
- ・ 絶対定量、相対定量 (相対標準曲線法、比較 Ct 法)、SNP の各解析に対応しています。
- ・ PCR 増幅産物を確認する融解曲線解析も行えます。
- ・ 測定結果はデータベースとして管理でき、検体ごとに自由なレイアウトで印刷できます^{※3}。
- ・ ソフトウェアは日本語・中国語・英語表示に対応しています^{※4}。

※1 2 色測光の場合は、それぞれに 7 秒かかります。

※2 反応容器に関しては、別途お問合せください。

※3 検体ごとの個別印刷機能は、絶対定量解析と SNP 解析のみに対応します。

※4 選択できる言語は OS の言語に依存します。日本語 OS は日本語と英語、中国語 OS は中国語と英語、英語 OS は英語のみ選択できます。