

MultiNA II によるヘテロ二本鎖移動度分析

曾我部 有司

ユーザーベネフィット

- ◆ 電気泳動の操作をほぼ全自動で実施することが可能です。
- ◆ ヘテロ二本鎖を移動度の違いで検出することができます。
- ◆ 多検体ゲノム編集個体の変異・欠失確認を効率的にスクリーニングすることが可能です。

■はじめに

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容易に適用できるようになってきたことから、ゲノム編集技術は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、その移動度はサイズ（分子量）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ります。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、マイクロチップ電気泳動装置MultiNA II MCE-301（図2）を用いて、モデルDNAによるHMAを検出した例をご紹介します。



図2 マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA™ II MCE-301

■分析サンプル

モデルDNAサンプルの設定

サンプルとしてhuman β -globinの一部の配列を選択しました。110bpを基準として、2塩基欠失させた108bp、5塩基欠失させた105pのモデルDNAを作製しました。それぞれをpEX-A2J1プラスミドベクターに挿入したものをPCRの鋳型として用いました。各モデルDNAの塩基配列は図3に示します。「*」は欠失を示しています。

>モデルDNA110bp

```
ACACAACGTGTTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTG
ACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACG
TGGATGAAGTTG
```

>モデルDNA108bp

```
ACACAACGTGTTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTG
ACTCC**AGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACG
TGGATGAAGTTG
```

>モデルDNA105bp

```
ACACAACGTGTTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTG
ACTC****GAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACG
TGGATGAAGTTG
```

図3 モデルDNAの塩基配列

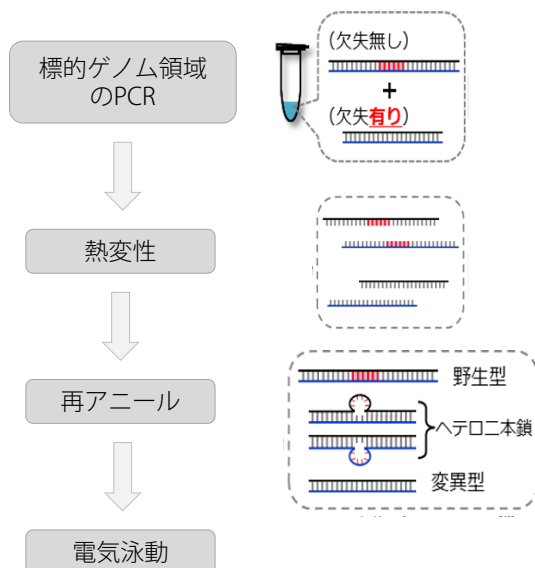


図1 HMA分析の流れ

PCR反応条件

前述したプラスミドを鋳型としてPCRを行い、モデルDNAとして設定した領域を増幅しました。PCRの試薬キットはKOD FX (TOYOBO) を用いました。反応液の組成とPCR反応のサイクル条件は図4の条件にて実施しました。

・ 反応液	
Sample	0.5 μ L
2xBuffer	5.0 μ L
dNTPs(2mM)	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 μ L	

・ PCRサイクル	
98°C	1min
98°C	10sec
60°C	15sec
68°C	15sec
68°C	7min
4°C	∞
} x30cycles	

図4 PCRの反応条件

ヘテロ二本鎖形成

前述の条件で反応した110+108bp、110+105bp、108+105bpのPCR産物をサーマルサイクラー SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific) を用いてヘテロ二本鎖を形成させました。反応条件は95°Cで5分の変性後、0.1°C/secで5°Cまで冷却し再アニールしました。

電気泳動

110bp、108bp、105bpのPCR増幅産物、110+108bp、110+105bp、108+105bpの未変性のPCR産物と110+108bp、110+105bp、108+105bpを変性再アニールしてヘテロ二本鎖を形成させたサンプルをマイクロチップ電気泳動装置MultiNA IIで分析しました。分析はDNA-500キットを用いました。

■ 分析結果

MultiNA II による電気泳動から図5A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110bp、108bp、105bpのPCR産物、続いて左から110+108bp、110+105bp、108+105bpの未変性の混合PCR産物の分析結果です。右側の3つは110+108bp、110+105bp、108+105bpのHMA分析結果です。

110bp、108bp、105bpのPCR産物は110bpと108bpの2bp差はほとんど判別できませんが105bpとの差は確認できました。また、未変性の混合PCR産物の110+108bpは1つのバンドとして検出されました。他の2つのサンプル(108+105bpは110+108bp)はそれぞれのバンドとして検出されました。

ヘテロ二本鎖を形成させた110+108bp、110+105bpおよび108+105bpのPCR産物は未変性のPCR産物とは異なるバンドがそれぞれのサンプルにおいて検出されました。これらの高分子側のバンド (図5B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。

■ まとめ

MultiNA II を用いたHMAにおいてヘテロ二本鎖を検出することができました。特に、110-108bpのHMAの結果では2bp差のヘテロ二本鎖を検出することができました。

MultiNA II 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、単独PCR産物、混合PCR産物、ヘテロ二本鎖処理PCR産物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。

ゲノム編集などの遺伝子操作を行った実験動物の個体数が多い場合、その変異導入や欠失の確認を行うには手間とコストを要します。MultiNA II を用いた自動分析を行うことで、短時間でのスクリーニングが可能となり、変異導入や欠失の確認作業の効率化に大きく貢献します。

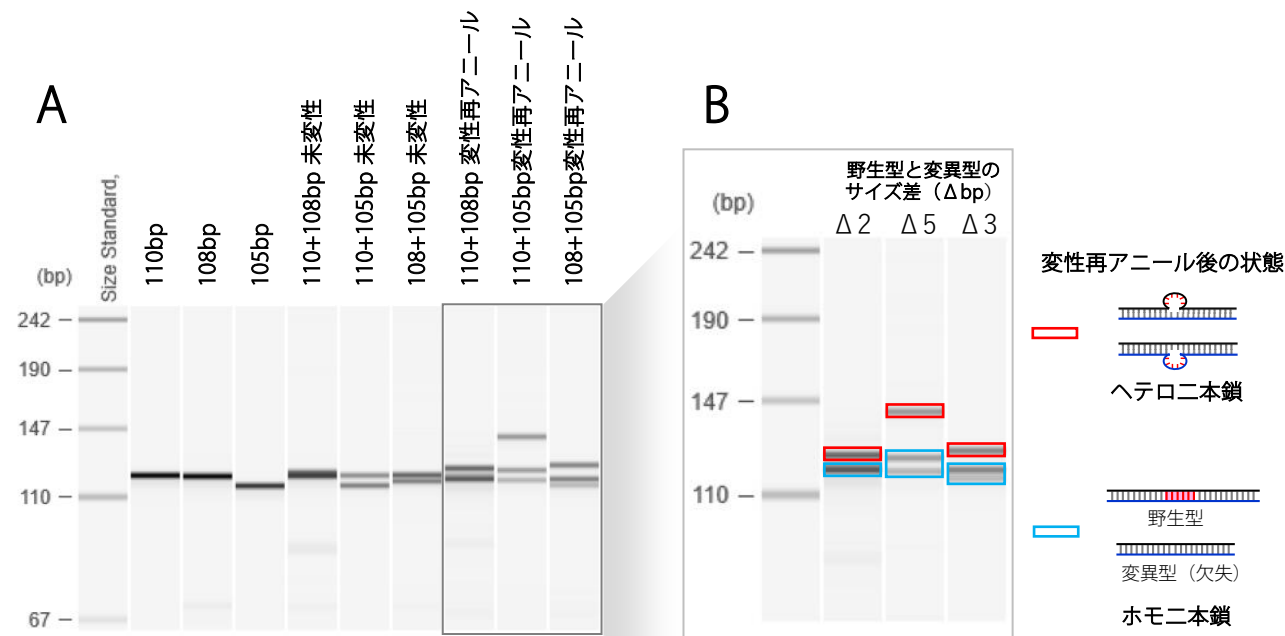


図5 MultiNA II による電気泳動結果 (ゲルイメージ)
A: PCR産物及びヘテロ二本鎖サンプルの電気泳動結果
B: HMAの結果の詳細

MultiNAは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

01-00828-JP 初版発行：2024年 11月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

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。本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、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。

▶ アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



▶ MultiNA II MCE-301

マイクロチップ電気泳動システム

関連分野

▶ ライフサイエンス

▶ ゲノミクス

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ