

Agilent2100 バイオアナライザを用いた DNA 多型検出技術

中村 貴子¹

筑波大学医学系技術室

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

Agilent Technologies 社の 2100 バイオアナライザは主に次世代シーケンサーのサイジングや定量に使用され、サンプルの注入、分離、検出等の分析をチップ上に組み込んだ分析装置である。この機器のサイジング機能、微量サンプル検出機能またゲルイメージのプレゼンテーション性を利用し、PCR サンプルをなるべく簡単に泳動するだけで目的フラグメントの分析や応用が可能か実験を行った。今回、DNA1000 キットを用い制限酵素解析、STR 解析への応用を試みた結果、利点と欠点が明らかになったので報告する。

キーワード:2100 バイオアナライザ 制限酵素解析 Mitochondria DNA D-loop STR 解析

1. はじめに

近年の Biotechnology 技術の発展には遺伝子を解析する機器の発達が密接に結びついている。それらの機器は正確かつ緻密で多くは蛍光色素などの反応を利用し成果をあげている。

一方バイオアナライザの専用チップは DNA 用や RNA 用など目的用途に応じて数種類発売されているが、要は電気泳動装置である。従来の平板アガロースやアクリルアミドなどを使用した電気泳動と比較し電気泳動装置として進化したこの機器を使い、どのような検出ができるかという挑戦としてこの研究を行った。疑問点などはメーカーに連絡し解決と改善を要求した。

2. 方法

2.1 DNA1000 キットの使用方法

Agilent DNA 1000 キットには専用の Gel、Dye、Marker (内部標準)、Ladder、また Gel をろ過するスピニフィルタが含まれている。マニュアルに従い DNA 用ラボチップ(図 1)に 9 μ l の調整ゲルを充填する。サンプルのアプライ量は 1 μ l 以下、1 チップで 12 サンプルまでアプライでき Marker とともにミキシングの後、機械にセットし泳動を開始する。

2.2 泳動サンプル作成方法

表 1 に示す Primer を用い annealing 58 $^{\circ}$ Cにて 35cycle PCR の後、目的に応じて直接または制限酵素処理等を行い、それぞれのラボチップの所定の孔にサンプル 1 μ l をアプライし泳動を開始した。

3. DNA1000 キット使用における知見

3.1 泳動の結果

サンプルは極細の毛細管中を移動し分析される。泳動は 1 サンプルにつき約 120 秒で 12 サンプルすべての終了時間は pre-run をふくめ約 40 分くらいである。結果はエレクトロフェログラム (図 2-1) 及びゲルイメージ (図 2-2) で表示され、検出バンドは upper (1500 bp)、lower (15 bp) Marker により調整され易動度が一定となる。検出されたフラグメントは泳動開始からの時間 (秒)、サイズ (bp)、ピーク面積から算出された濃度 (μ g/ml) が下部の表 (Clipboard) により示される。50 bp 以下で普通のアガロースゲルでは検出不可能な極めて濃度が薄い DNA フラグメントでも検出が可能であった。エレクトロフェログラムは拡大や解析値の変更によるピーク加、ピークの省略また重ね合わせ比較ができ、ゲルでは判別がつかない細かな解析に有効であった。しかしながらホルムアミドなどの DNA 変性剤などが混じたサンプルは使用ができなかった。

3.2 サイジングについて

市販の Ladder Marker はブルー色素と Buffer をカラム精製で除きサンプルとした。

塩基数が既知のサンプルとして ALDH (135 bp) と CCK (229 bp) を用い、(A) カラム精製を行ったもの、(B) PCR 産物を直接用いるものを比較の対象とした (図 3)。

フラグメントバンドの上の数字は実際の塩基数 (サイズ)、下の数字は機器分析値で、両者は異なる値であった。また市販の marker による結果はすべてサイズが不ぞろいで、この結果を受け分析にはサイズによらない方法が必要と考えた。メーカーの説明ではこの機械のサイズ決定真度が ± 10 % であり、また機器分析値と塩基数が異なるのは、PCR 産物に含まれる Buffer が易動度に影響があるのではという回答であったが今回の実験の結果では (A) と (B) で易動度の差は認められなかったことから PCR 産物を直接泳動しても差し支えないと考えた。

¹ E-mail: jurakiko@md.tsukuba.ac.jp; Tel: 029-853-3274

4. 遺伝子解析への応用と結果

4.1 PCR 産物直接泳動による Amelogenin 遺伝子解析

Amelogenin 遺伝子は性染色体上にあり、男性では 2 本 (112 bp, 106 bp)、女性では 1 本 (106 bp) のバンドが検出できる。検出には PCR 後アガロースゲルで確認する方法と蛍光 primer 法があるが、アガロースゲルでは肉眼的に判別が困難な場合がある (図 4.1)。このキットを使用した方法ではゲルバンドで直接確認できるほか濃度が薄い場合もエレクトロフェログラムで 1 ピークと 2 ピークが区別が示され (図 4.2)、また Primer もノンラベルで良いため、手軽にできる方法ではないかと考えた。

4.2 制限酵素解析

4.2.1 KCNJ6 rs2070995

PCR 産物の全長 151 bp。制限酵素 *Hap* II により -CCGG- が認識され切断箇所は 2 か所それぞれの断片長が 15 bp 以上異なるためアジレントゲル法によらなくてもアガロースゲルでも判別可能であった (図 5)。

4.2.2 Alcohol 脱水素酵素(ADH)

PCR 産物の全長 154 bp。制限酵素 *Mae* III により -GANAC- が認識され切断箇所は 2 か所。うち 1 か所は共通認識部位ですべて切断されるが (57 bp)、SNP 箇所の Arg (CGC) 配列を持つ 1 型は切断されず、His (CAC) 配列を持つ 2 型は切断される^[1]。アガロースゲルによる判定は 31bp が薄く判定しにくい上、57 bp と 62 bp の分離が不明の場合があり 1 型と 2-1 型の誤判定をまねき易かったが、このキットでは正確に分離し良好な結果を得た (図 6)。

4.2.3 Mitochondria DNA D-loop(HV-1)

Mt-DNA の HV-1 は超可変領域^[2]、この領域を制限酵素で切断し型判定を行うには多種の制限酵素を必要とする。すべての切断図を一つの図に表すのは煩雑であるため判定結果を示す手段はほぼシーケンスだけであることから、昨今の証拠の画像化を踏まえ一般の人にわかりやすく差異を示す方法としてバイオアナライザの分離能を利用することを考えた。

HV-1・16180 から 16320 付近には C/T の変異箇所が並び、*Mnl* I で認識できる箇所が多い。このことは反対に考えれば切断箇所が多いため断片が複数になる上、ゲルでの分離が複雑で判定不能となる要素を含む。今回は多数箇所の制限酵素利用による判定方法の一つとして試みた。(図 7-1) の領域の断片長を考えながらプライマーを設計し PCR 増幅の後、制限酵素 *Mnl* I にて切断した。認識部位は -CCTC- でその部位の 7 塩基先で切断される。

HV-1, 16189, 16192 など主なポイント 7 か所の C/T 変異の組み合わせにより可能性として 40 パターン以上の断片図が考えられた。さらに泳動パターンから見て稀な変異があることも考えられ読み取りが非常に複雑であった。しかし読み取れる同型

と思われる泳動パターンが多数検出されそれらのシーケンスも行った結果、変異箇所の差異による多型をバンドパターンとして視覚的に表すことができた (図 7-2, 図 7-3)。

4.3 STR 解析

STR 多型 (Short Tandem Repeat Polymorphism) とは DNA の中に数塩基から 10 塩基未満の短い DNA の繰り返し領域が存在し、その反復数は人によって違いがあり個人識別の最有力な解析方法となっている。現在は蛍光色素を用いたキットが発売され特定の機器分析が一般化されているが、STR が DNA 鎖長の差異の検出であることから、この方法が応用できないか検討した。この機器のサイジング能は実際の塩基数サイズのズレはあるものの、近い範囲の塩基数の数の幅はほぼ正確にあらわされることから今回は比較的近傍にコピー数が集まるものから分析を行った。またメーカーの説明では限界値が 5 bp (5 塩基) でそれ以下は読み取り困難とのもであったが、STR 解析は 4 塩基繰り返しが多いことから 4 塩基繰り返しでの STR 解析を試みた。

4.3.1 DXS-6789 (GATA)n

X 染色体上の DXS-6789 (GATA)_n を用い通常の PCR 反応により増幅し、基本的にはそれをそのまま泳動するだけでよく、特別な試薬は必要としない。

あらかじめ他の分析法によりコピー数が分かっている 22 回繰り返しの男性サンプル (スタンダードサンプル - S.S) を基準として、4 bp ごとのサイズに合致したサンプルを集めオリジナルのラダーメーカーを作り、未知のサンプルに当てはめていった。またレーンの違いによる若干の泳動のズレを補正するためサンプルすべてに S.S を等量加え内部標準とした。

この結果、サンプルの繰り返し数を読み取ることが可能となった。ただし今回用いた DXS-6789^[3] ^[4] は 14 回から 25 回、長さで 50 bp 以内の繰り返し範囲に限定されるため、4 bp ごとの値がほぼ正確に当てはまったが、リピート数の種類が多く、全体の長さが長い場合はこの条件が当てはまらず、今後の研究課題である。

この領域は X 染色体上にあるため男性の場合一本のバンドしか現れず、S.S と異なるバンドはそのバンドのリピート数で判定できる。S.S バンドのみ示された場合は S.S に重なる同じリピート数と理解できる。しかし女性のサンプルでは S.S 以外に 2 本のバンドが観察される場合と S.S 以外に 1 本のバンドのみ検出される場合がある。前者はヘテロと判定されるが (例, No22, S3)、後者は 1 本が S.S と重なったヘテロ (例, No12, S1) か S.S とは重ならないホモかが問題となる。この解決法としては S.S をはずしたサンプルを再泳動する方法と (例, No19, 1M+S.S, No20, 1M)

他の方法として Clipboard 上の Conc (ng/μl) において、S.S と重なるヘテロの場合は S.S の濃度にサンプル自身の濃度が加わることから、濃度が高く表示されるが、ホモの場合は S.S のレーンで示される濃度が表示されるということを利用する手段もある (図 8-1, 図 8-2)。

5. まとめ

バイオアナライザ DNA1000 キットを用い、さまざまな条件の実験を行った結果、確認できた長所、短所をまとめた。

1. 平面ゲルのようなゆがみによる泳動の乱れが少なく毎回同じ条件のきれいな泳動図が示せた。
2. パソコン上で拡大分析や必要なピークを検出できることが可能で、そのため微量のサンプルでも分析が可能であった。
3. サイジングに問題点が多く、今回はサイジングに頼らずに行った STR 解析が可能であったが分離能の点から 3 塩基以下のサイズのコピー数の判別は困難であると思われる。
4. 制限酵素切断図では 50 bp 以下でも判別ができ、今回 3 bp ほどの差異も判別可能であった。この結果は 3 と矛盾するが、異なるレーンで泳動する場合においては、3 bp ほどの差異もバンドのズレによって認識できた。
5. 分析条件の工夫により長所を取り入れ、使用範囲が広がる可能性があると思われる。

6. 謝辞

今回の基礎的実験を快く承諾していただいた筑波大学人間総合科学研究科法医学、本田克也教授に深く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Alcohol and aldehyde dehydrogenase genotypes and drinking behavior of Chinese living in Shanghai. Muramatsu T, Harada S, et al. Hum Genet. 96 (1995) 151-154.
- [2] Mt-DNA polymorphism in East Asian Populations, with special reference to the peopling of Japan. Horai S, Omoto K, et al. Am J Hum Genet. 59 (1996) 579-590.
- [3] X-Chromosome STR sequence variation, repeat structure, and nomenclature in humans and chimpanzees. Gomes I, Prinz M, et al. Int J legal Med. 123 (2009) 134-149.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00414-008-0303-x>
- [4] Sixteen X-chromosomal STRs in two octaplex PCRs in Japanese population and development of 15-locus multiplex PCR system. Nakamura Y, Minaguchi K. Int J legal Med, 124 (2010) 405-414.
<http://dx.doi.org/10.1007/s00414-010-0467-z>



図 1. DNA1000 チップ サイズ 5 cm × 5 cm
調整ゲル 9 μl とサンプル 1 μl は直径 3 mm のサンプル孔に注入する

表 1. PCR に使用した Primer 配列

ALDH GCT-3'	F	5' -CAA ATT ACA GGG TCA ACT
	R	5' -CCA CAC TAA CAG TTT TCA CTT-3'
CCK-45 C-3'	F	5' -GAT TAA CTC CAC CCC ACT AGA
	R	5' -TGG GCG TTT CCA ACC GGA GCA-3'
ADH G-3'	F	5' -AAT CTT TTC TGA ATC TGA ACA
	R	5' -AAC ACT CTC CAC GAT GCC GG-3'
DXS6789	F	5' -TCG AAA AGA TAG CCA ATC ACT

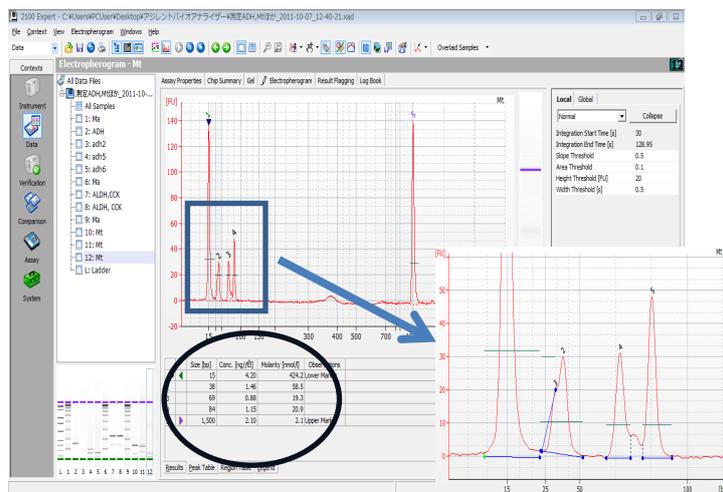


図 2-1. 分析結果—エレクトロフェログラム
泳動されたフラグメントがピークで示され拡大や解析値の変更によりピーク加、ピーク省略、ピークを重ね合わせ比較などができる。拡大した図のピーク 2 の肩にピーク 3 を加えた。下部の線で囲んである表にサイズ (bp)、濃度 (μg/ml) などの結果が示される。

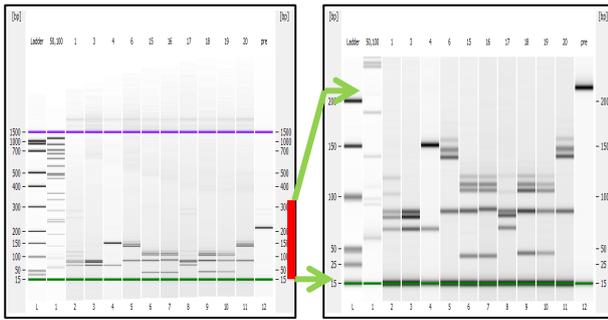


図 2-2. 分析結果—ゲルパターン
泳動されたフラグメントをゲル画面で表示させたもの (左図)
適当な大きさに拡大したゲル画面 (右図)

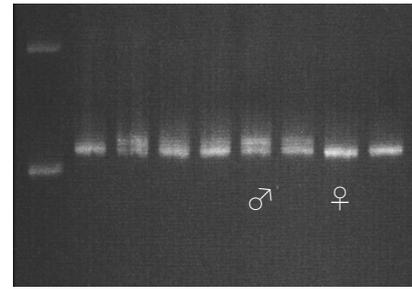


図 4-1 アガロースゲル泳動分析
はっきりと増幅されたものは判別できるが、Y 染色体上バンドが薄いものは判定ミス
の恐れがある。

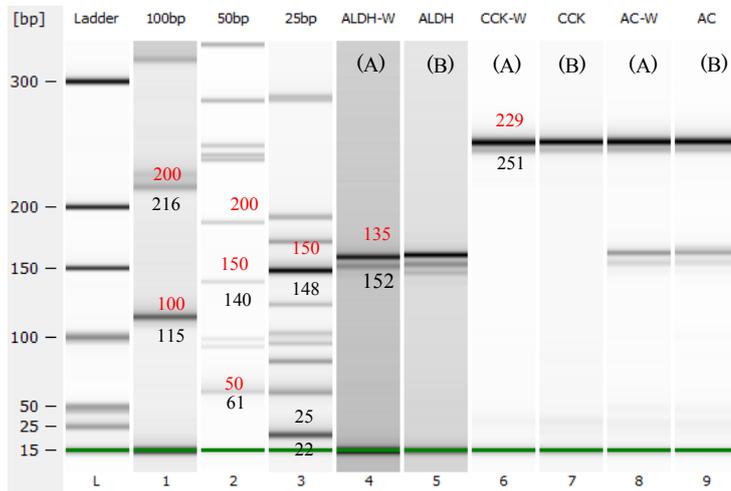


図 3. 機器分析値(サイジング) の検討
フラグメントバンドの上の数字は実際の塩基数(サイズ)、下の数字は機器分析値で、両者の値は異なっている。ALDH は 135 bp、CCK は 229 bp を増幅したが、分析値ではそれぞれ 152 bp、251 bp とされた。また市販の marker はすべてサイズが不ぞろいであり、PCR 後 カラム精製を行ったもの (A) と PCR 産物を直接泳動したもの (B) を比較すると、Buffer 等の影響による易動度の変化はない。

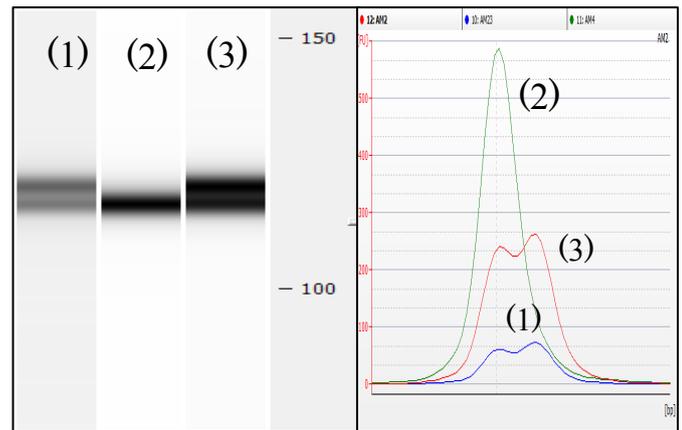


図 4-2 バイオアナライザー分析
ゲルイメージで 2 本バンド (1) 男性と 1 本バンド (2) 女性が判別できるが、ピーク画面ではサンプル量が多くバンドの確認が難しかった (3) も 2 ピークと判別され男性と判定できた。

図 4. Amelogenin パターンの検出

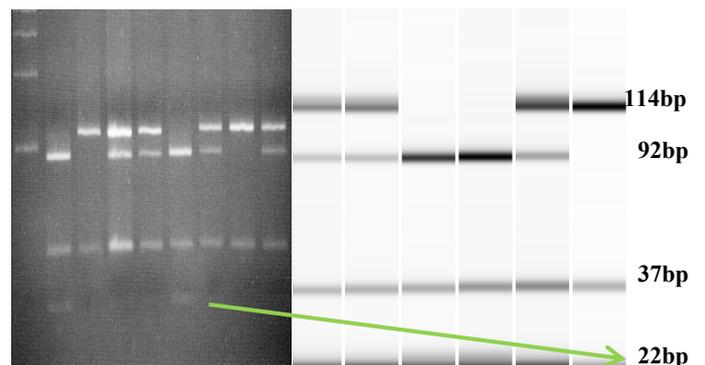


図 5 制限酵素解析 KCNJ6 rs2070995 の多型検出
Hap II (CCGG) 処理後カラム精製を行い泳動。各型共通フラグメント 37 bp。SNP 箇所が G で切断された 92 bp、22 bp および SNP 箇所が A で切断されない 114 bp のフラグメントが観察された。フラグメント鎖長の差が大きいのでアガロース(左図)でも判別可。アジレントでは 22 bp が基線に隠れて判別しにくい(右図)。

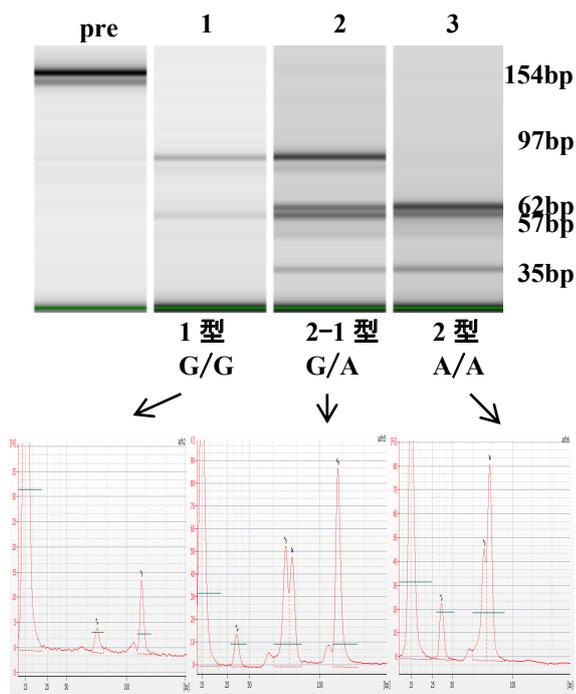


図 6. 制限酵素解析 Alcohol 脱水素酵素の多型検出

Mae III 処理後カラム精製を行い泳動。各型共通フラグメント 57 bp と ADH 多型によるフラグメントがゲルおよびピーク図で確認された。濃度が薄い 1 のサンプルはアガロースゲルでの検出は困難であったが、アジレントゲルでは検出された。アガロースゲルでは 62 bp と 57 bp の識別は非常に困難で 35 bp のバンドが見えにくい場合に 1 型と 2-1 型の判定は難しい。

16131	TACCATAAAT	ACTTGACCAC	CTGTAGTACA	TAAAAACCCA	ATCCACATCA	AAACCC CCCC	CCC ATGCTTA
16201	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCTTCAACTA	TCACACATCA	ACTGCAACTC	CAAAGCCACC	CCTC ACCCAC
16271	TAGGATACCA	ACAAACCTAC	CCACCCTTAA	CAGTACATAG	TACATAAAGT	CATTACCGT	ACATAGCACA

図 7-1. Mitochondria-DNA 塩基配列

領域の塩基配列と primer (太字) の位置および制限酵素の認識部位と切断箇所
制限酵素 Mnl I で -CCTC- を認識しその 7 塩基先を切断する。

グリーンの塩基は変異部位で個体により C→T、T→C と変異する。

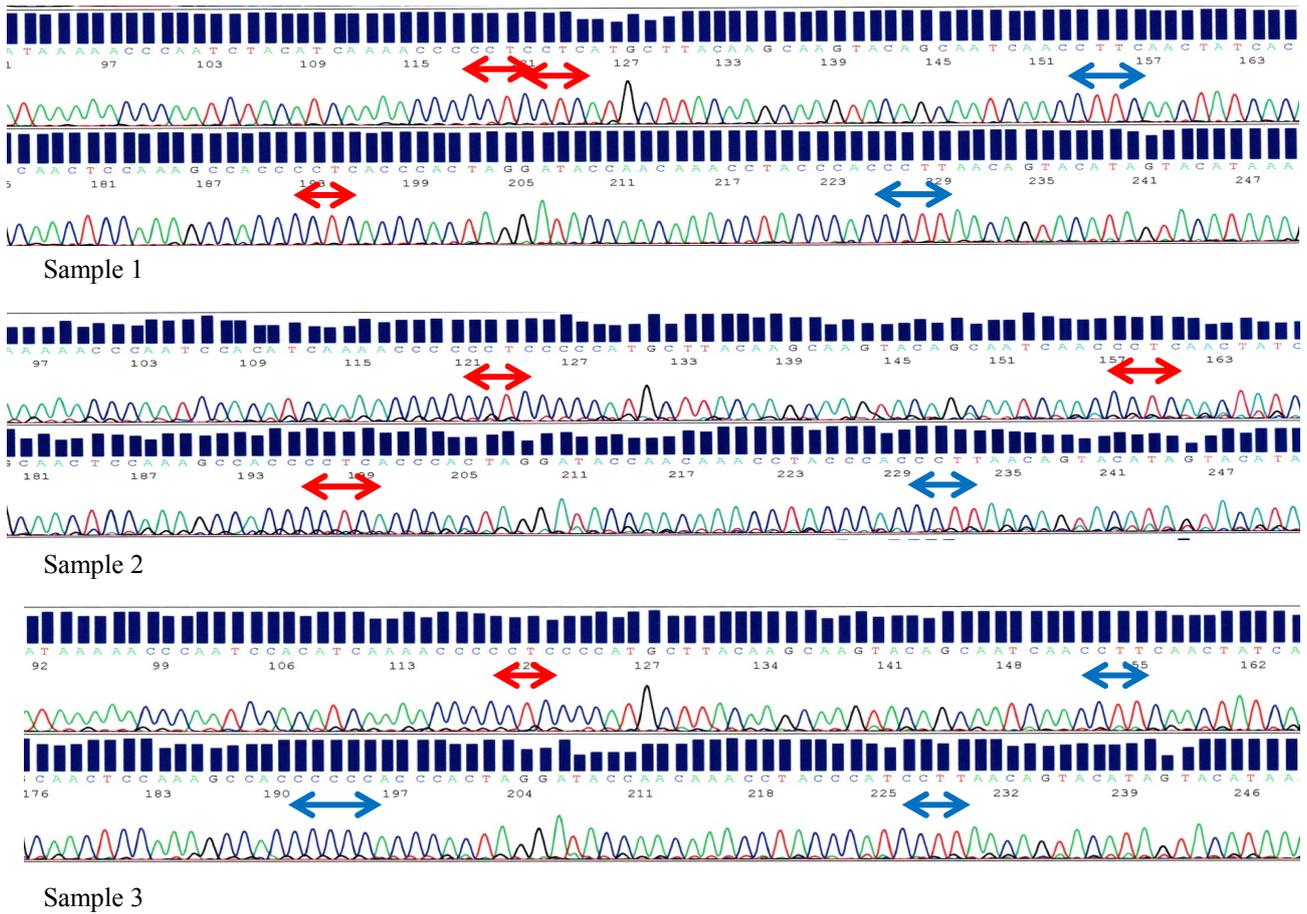


図 7-2. Mitochondria-DNA Sequence
実際の領域 Sequence 図で切断認識箇所はそれぞれのサンプルで異なりそれによってフラグメント長が変化する。例として Sample 1, 2, 3
赤の矢印は切断認識配列で青の矢印は切断しない配列

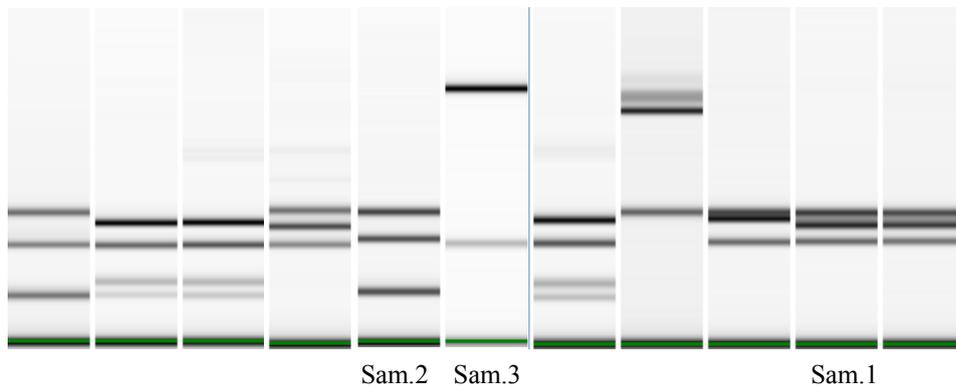


図 7-3. アジレントゲルの泳動結果
切断フラグメントの長さの差異により易動度が異なりさまざまな泳動パターンに分かれる。Sam. 1, 2, 3は図 7-2 で示した sequence に対応。

図 7. 制限酵素解析 Mitochondria-DNA

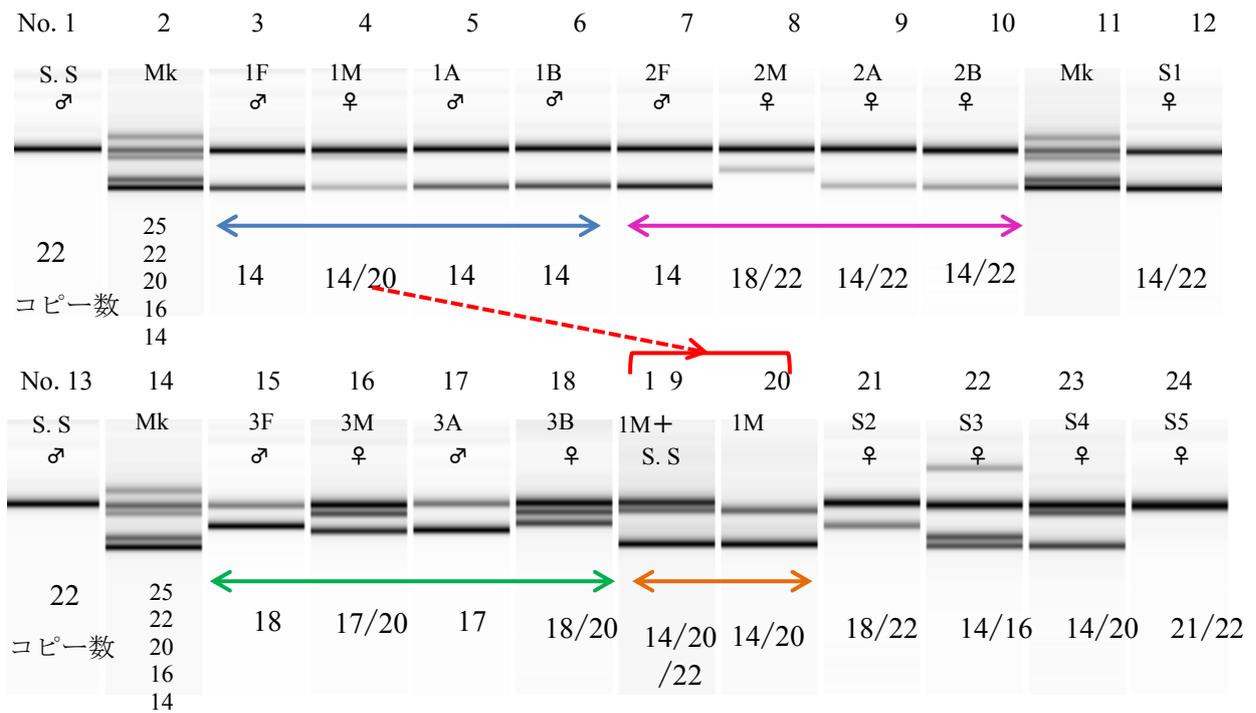


図 8-1. STR 解析 DXS6789 の検出とゲルパターン

レーン No. 1, No. 13 はスタンダード・サンプル(S.S)で 22 コピーである。S.S をすべてのサンプルに等量加えて泳動した。両側矢印⇔の範囲内の 4 サンプルは家族サンプルで父(F), 母(M), 子(A), 子(B)と表示。下の数字は(GATA)n の繰り返し数。Mk はコピー数の異なるサンプルを組み合わせたオリジナルマーカー。

オレンジ両側矢印⇔の No. 19 は 1M がホモバンドか 22 回繰り返しを含むホモかの確認で No. 20 で 22 回繰り返しサンプル(S.S)を除いた結果ヘテロが確認できた。

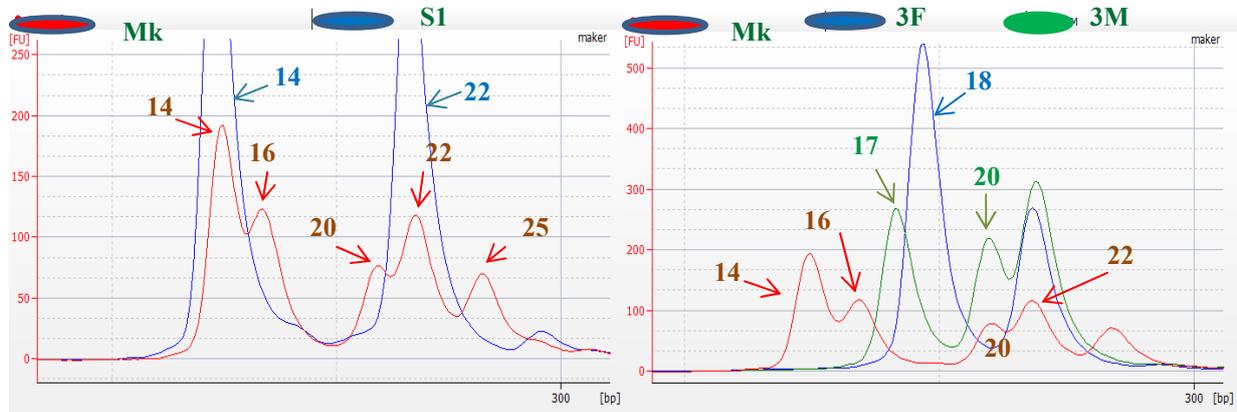


図 8-2. STR 解析 DXS6789 の検出: エレクトロフェログラムにてピークの重ね合わせ比較するとコピー数が理解しやすい。赤線のマーカー(Mk)にサンプルを重ね合わせコピー数を検出した。左図は No. 12 の S1 で 22 コピーに重なるピークと 14 コピーに重なるピークを検出。右図は No. 13 の 3F (18 コピー)と No. 14 の 3M (17/20 コピー)と判定され、子供は男児 18 コピー、女児 18/20 コピーとなり親子に矛盾はなかった。

図 8. STR 解析法

The DNA polymorphic detection technique using the Agilent2100 bio-analyzer

Takako Nakamura

Technical Service Office for Medical Sciences, University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575
Japan

The 2100 bio-analyzer of Agilent Technologies is the electrophoresis apparatus which incorporated the analysis of a detection, an intrusion of a sample, a separation, etc. on the small chip board.

I use the sizing-system, the trace sample detection facility and gel imaging system of this device, I carried out the electrophoresis of the PCR sample, and checked of the fragment analysis is possible.

In this time, the result of tried the application to RFLP analysis and STR analysis using DNA1000 kit, since the merit and the shortcoming became clear

Keywords: 2100 bio-analyzer of Agilent Technologies, Restriction fragment length polymorphism analysis, Mitochondria DNA D-loop, Short tandem repeat polymorphism analysis