

2100 バイオアナライザを利用した ミトコンドリア DNA PCR の最適化 アプリケーション

ゲノミクス

著者

Mark Jensen
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

要旨

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 産物を分析して反応をモニターする場合は、ターゲット配列の増幅収量を見るだけでなく、プライマーダイマーやミスプライムによる副産物の収量を加味しながら PCR 反応の最適化を図ることが必要不可欠です。この検討を行うためには、サイズと濃度が幅広く分布する PCR 産物の、正確かつ再現性の良い分析を行う必要があります。2100 バイオアナライザは、PCR 反応で生成されたすべての産物、副産物を迅速に定量分析できるため、PCR 条件の開発および最適化を容易にします。

はじめに

PCR の最適化は、時に非常に時間のかかるプロセスになります。特に、増幅したい断片が比較的長く、融解温度が極端に低い、あるいは高い場合には、うんざりするほど時間がかかるでしょう。最適化の目的は、ターゲットの産物収量を最大化しながら、プライマーダイマーやミスプライムによる副産物の生成を最小限に抑えることです。ゲルを用いた電気泳動による増幅産物の分析では PCR 副産物について正確な定量情報を得ることが難しいため、このような最適化の際にはあまり有効ではありません。定量的な数値情

報がないと、たとえ時間のかかる煩雑な PCR 反応条件検討の作業をいくら行っても、結局のところ選択性の欠けており収量も低い PCR 結果になりかねません。

2100 バイオアナライザは、そのような PCR プロセスの最適化にまつわる問題に対処するために理想的なツールです。単に副産物を正確に、再現性のある方法で測定だけでなく、ターゲットの配列に近いサイズの副産物を分析、定量することもできます [1]。2100 バイオアナライザではすべての反応生成物を定量できるため、特定の反応パラメータと PCR 反応全体の効率の関係を数値化することができます。ここで見いだした関係は、後に最適な反応条件を求める際に利用することができます。

ミトコンドリア DNA (mtDNA) の PCR 増幅は数多くの難関があるため上記最適化の良い例です。人間の mtDNA は小さな (16,569 bp) 環状ゲノムで、37 の遺伝子を含み、細胞質内に存在します。ミトコンドリアゲノムには、D ループあるいは制御領域として知られる 1100 bp の非翻訳領域があります。その D ループの中には DNA 配列の個体差が大きい領域が 2 つあります。この領域、超可変領域 1 (HV1) および超可変領域 2 (HV2) の配列には、身元確認試験 [2,3] で利用できるほどの多様性が見られます。

十分な量のゲノム DNA (gDNA) をサンプルから抽出できないとき、この mtDNA が次善の解析ツールとなります。それは、一つの細胞の細胞質でも最高で 1000 もの mtDNA を含んでいることがあるからです。mtDNA は、骨や歯、髪といった小さい、あるいはかなり分解が進んだサンプルからでも抽出することができ、PCR によって増幅することもできます。増幅された生成物は DNA の配列解析に使用されます。



Agilent Technologies

サンプルが分解すると DNA 断片の平均サイズが小さくなるため、HV 領域の増幅に必要な PCR の回数はサンプルの経年数と状態によって変わります。DNA の分解が少ない場合は、それぞれの HV 領域を一回の PCR で増幅することができますが、分解がかなり進んでいるサンプルでは HV 領域を増幅するのに 100 bp-200 bp の PCR 反応の繰り返しが必要になります。こういったサンプルにはさまざまな増幅戦略が必要とされるため、特徴のある mtDNA 配列増幅の例は、PCR 増幅の最適化に 2100 バイオアナライザが適用できるかどうかを示す重要な例となります。

メソッド

この研究目的のため、4 つのミトコンドリア DNA 配列を用いて増幅効率に対する pH, Mg 濃度、および Taq ポリメラーゼ活性の与える影響を評価しました。DNA 抽出中の差異が分析結果に影響を及ぼさないようにするため、本研究の最初に DNA の大量抽出を行いました。この抽出 DNA は、PCR 条件検討用に希釈、分注しました。抽出プロトコルは以下の通りです。

DNA の調製

1. 毛根がついたままの毛髪 10 本を 0.2 mL の抽出バッファに加え、56 °C で 3 時間インキュベートしました。
2. ボルテックスし、95 °C で 8 分間加熱しました。
3. 混合液を 15,000 g で 5 分間、遠心分離機にかけました。
4. 100 µL を取り、PCR 増幅用の PBS 900 µL と合わせました。
5. 希釈抽出サンプル/PCR を 5 µL 使用しました。

抽出バッファ

抽出バッファの成分は、0.137 M NaCl、0.0027 M KCl、0.010 M Na₂HPO₄、0.0018 M KH₂PO₄ 中の Chelex 100 6.0% で、pH は 7.4 です。

PCR の最適化検討には Invitrogen 社の Invitrogen PCR Optimizer Kit を使用しました。このキットには、pH 8.5-9.5, Mg 濃度 1.5-3.5 mM の範囲で 10 のバッファが含まれています。これらの反応バッファをそれぞれ 4 つの mtDNA 断片の増幅反応で評価しました。バッファの内容は表 1 に示されています。

表 1. バッファ組成

成分	1 組成
バッファA	1.5-mM MgCl ₂ , pH 8.5
バッファB	2.0-mM MgCl ₂ , pH 8.5
バッファC	2.5-mM MgCl ₂ , pH 8.5
バッファD	3.5-mM MgCl ₂ , pH 8.5
バッファE	1.5-mM MgCl ₂ , pH 9.0
バッファF	2.0-mM MgCl ₂ , pH 9.0
バッファG	2.5-mM MgCl ₂ , pH 9.0
バッファH	3.5-mM MgCl ₂ , pH 9.0
バッファI	1.5-mM MgCl ₂ , pH 9.5
バッファJ	2.0-mM MgCl ₂ , pH 9.5

反応バッファのほかに、Taq ポリメラーゼを 1、1.5 および 2 ユニット/反応という 3 つの濃度で評価しました。

プライマーの選択

プライマーの結合場所は、かなり分解が進んだサンプルの増幅に対して米国の AFDIL (the Armed Forces DNA Identification Laboratory) で推奨されている場所を選択しました [4]。ただし、いくつかのケースでは、すべてのプライマーの融解温度™ に合わせるためにプライマーの結合場所を少しずらしました。プライマーは、mtDNA ゲノムの D ループ中の HV 領域で結合しました。HV1 に 2 セットのプライマー、HV2 にもまた 2 セットのプライマーを使用しました。プライマーの結合場所を図 1 の概略図に示します。

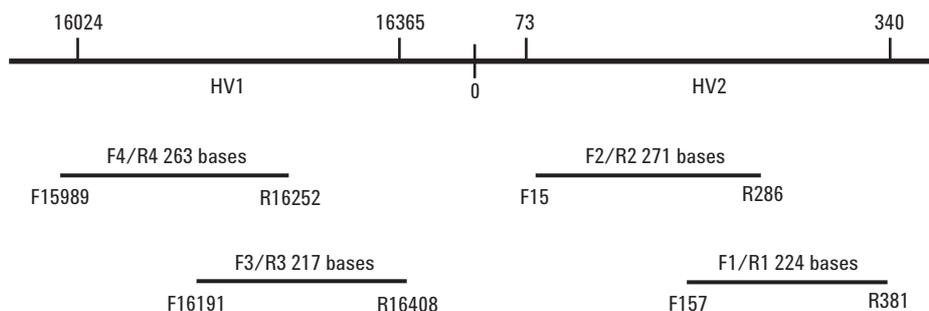


図 1. プライマーの結合場所の選択：塩基位置はアンダーソン標準配列から決定 [5]。

4種類の増幅にて、目的産物と副産物の収量について評価しました。これまでの研究で、最適なプライマー濃度は0.4 μ M、アニール温度は55 $^{\circ}$ Cと判定されている条件については、ここでは詳しく述べることはしません。

結果

4種類の mtDNA 増幅反応の典型的な生成物プロファイルを、図2の電気泳動図に示します。

図2Aでは、予想されるターゲットのサイズ領域に2つのピークがあります。これはC-ヘテロプラスミーとして知られる現象で、1個体の mtDNA の中でもシトシン連続領域において多形が存在していることを示しています。図2B

と2Cにはどちらも一つの均質な増幅産物が含まれており、配列解析に適していることがわかります。図2Dは、C-ヘテロプラスミーのさらに極端な例です。2Aおよび2Dの増幅産物の配列分析では、C-ヘテロプラスミー以降の配列データは役に立ちません。

C-ヘテロプラスミーは一つのサンプル中で異なる配列が混ざり合っている結果であるため、このアプリケーションノートで論じられている増幅条件を変えることでこの状態を改善することはできません。この問題は通常、C連鎖以降で追加のプライマー結合場所を選択しなおすことによって克服することが可能です。

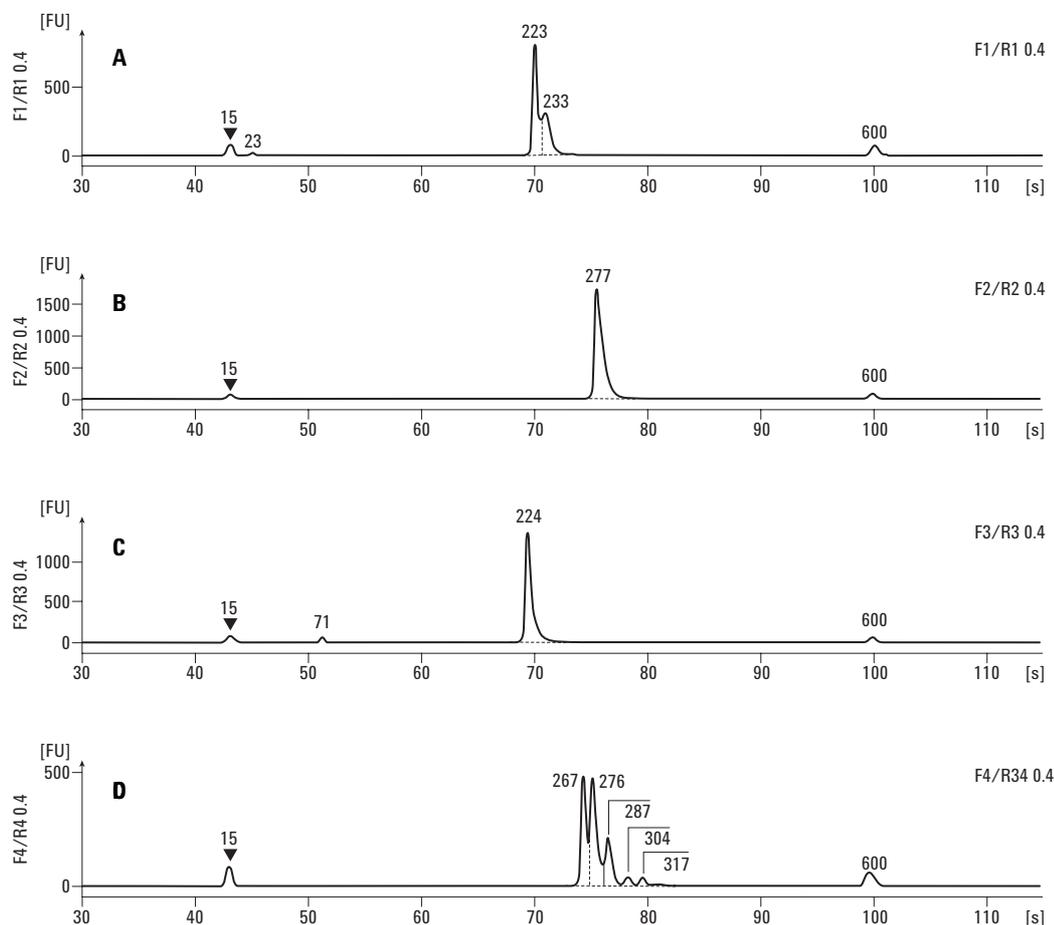


図2. 4種類の mtDNA PCR 産物の2100 バイオアナライザ電気泳動図
(A) F1/R1 - 224 bp、(B) F2/R2 - 271 bp、(C) F3/R3 - 217 bp、および (D) F4/R4 - 263 bp。

増幅収量に対する [Mg] の影響を求めるため、8.5, 8.7 および 9.0 という 3 つの pH で 1.5-3.5 mM の範囲の Mg 濃度を調べました。pH 8.7 の反応バッファは、等量の pH 8.5 および pH 9.0 反応バッファを Mg 濃度一定で混和することによって調製しました。4 種の mtDNA 増幅産物の収量に対する Mg 濃度の影響は図 3 に示します。

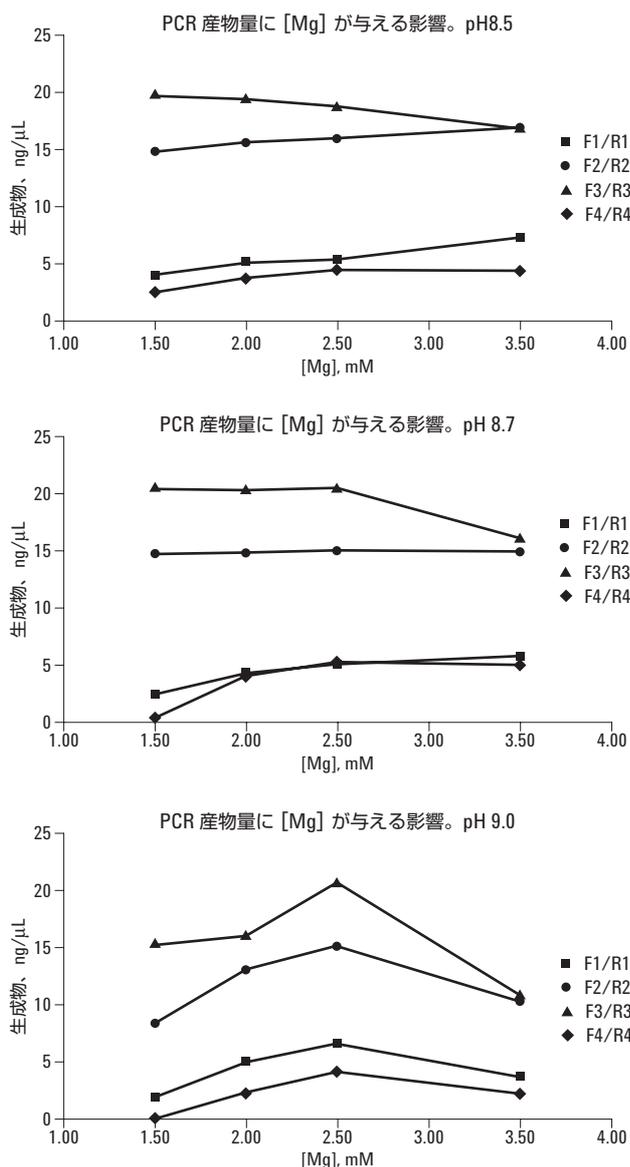


図 3. PCR 増幅に対する Mg 濃度の影響

収量グラフから、Mg の与える影響が pH と配列の両方に依存していることがすぐに見とれます。pH 8.5 では、4 つのうち 3 つの mtDNA 産物で Mg 濃度の増加に伴って収量が継続的に増加していることが示されています。これらの増幅反応のうち 2 つ、F3/R3 および F4/R4 では、同じ Mg 濃度範囲で副産物の方がより速く増加していることがわかりました（データはここでは示されていません）。pH を 8.7 に上げると、F3/R3 と F4/R4 の増幅産物だけが Mg 濃度の増加で収量が増加します。pH 9.0 では、4 つの増幅産物すべてについて Mg 濃度 2.5 mM で収量最大となることがはっきりと示されています。

Mg 濃度一定で pH の与える影響を、8.5~9.5 の pH 範囲で評価しました。図 4 は、Mg 濃度が 2.0 mM で pH を変化させたときの影響を示しています。

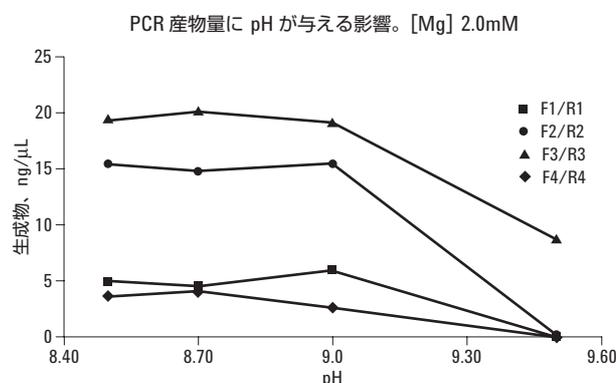


図 4. 反応バッファの pH 濃度が産物収量に与える影響。

2.0 mM の Mg 濃度における最大収量は、4 つの増幅産物すべてにおいて pH 8.5 と 8.7 に集中していることがわかります。増幅産物 F4/R4 の収量が pH 9.0 で大きく減少していることが見てとれます。pH 9.5 では、4 つの増幅産物すべての収量が著しく下がっていることが示されています。

ターゲットおよび副産物の生成に与える Taq 活性度の影響は、pH 8.5 で 2.5 mM の Mg を含んでいるバッファ C で調査しました。その結果を図 5 に示します。

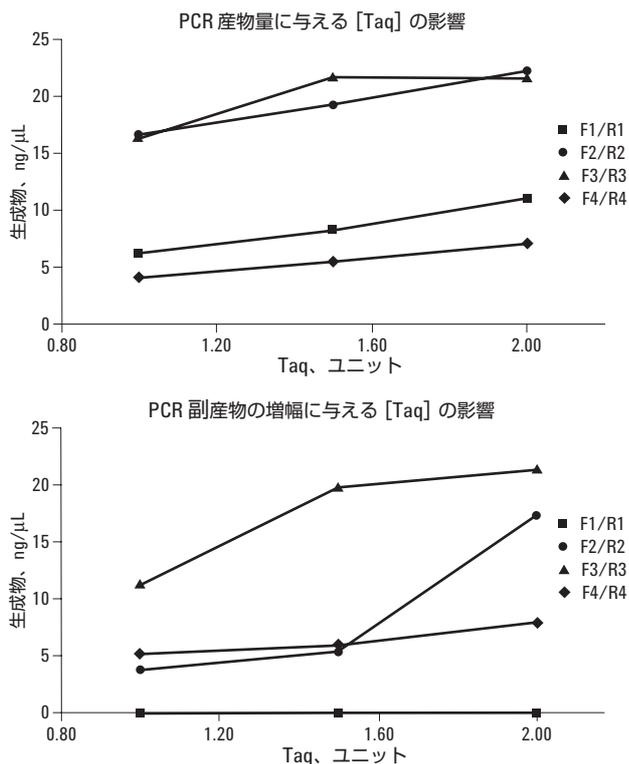


図 5. 目的 PCR 産物および副産物の収量に与える Taq 活性度の影響力

ターゲットの収量が Taq 活性度に伴って増加している観察結果は特筆すべきことではありませんが、副産物の増加率が Taq 活性の上昇に伴って 3 種類で急激に増加していることに注目してください。ターゲット産物と副産物の比率を調べた結果、反応 1 回あたり Taq を 1 ユニットのみ使用すると、最も良い値が得られることが示されています。

結論

PCR 反応を最適化するためには、事前にある程度 反応パラメータを振って試す必要性は避けられないでしょう。また、この最適化には、すべての PCR 反応において、ターゲットと副産物の両方の生成物を正確に定量することが必要とされます。mtDNA ゲノムの HV1 と HV2 中の 4 つの増幅産物で、最も品質が高いターゲット増幅産物は、2.0 mM の Mg 濃度、pH8.7 で Taq ポリメラーゼを 1 ユニット使用するという条件で達成されました。

Agilent 2100 バイオアナライザは、mtDNA の増幅産物と副産物の両方を迅速に定量分析することによって、PCR 最適化のプロセスを容易にすることに貢献しています。その大きなダイナミックレンジによって、濃度に 10 以上の開きがあるターゲット産物と副産物の収量比較を可能にしました。pH、Mg 濃度、Taq 活性度といった反応パラメータと、ターゲット産物と副産物の相対収量の関係を正確に評価することによって、質の高いターゲット PCR 産物を最も高い収量で生成する反応条件を見いだすことができます。

参考文献

1. M. Jensen. "Use of the Agilent 2100 Bioanalyzer and DNA 500 Lab-on-a-Chip in the Analysis of PCR Amplified Mitochondrial DNA", Agilent Technologies, publication 5989-0985E, www.agilent.com (日本語訳「Agilent 2100 バイオアナライザと DNA 500 ラボチップによる PCR 増幅ミトコンドリア DNA の分析」Agilent Technologies, Pub.No. 5989-0985JAJP, www.agilent.com/chem/jp)
2. B. Budowle, M. Allard, M. Wilson and R. Chakraborty. "Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates and Foundations" (2003) Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 4, 119-141.
3. J. Butler, "Forensic DNA Typing", Academic Press, New York, 2001.
4. M. Gabriel, E. Huffine, J. Ryan, C. Los, N. Yang M. Holland and T. Parsons, "Improved Strategies for mtDNA Sequence Analysis of Highly Degraded Forensic Remains", Genetic Identity Conference Proceedings, Tenth International Symposium on Human Identification, Orlando, FL, 1999.
5. S. Anderson, A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. De Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. (1981) Nature, 290, 457-65.

さらに詳しくは...

当社の製品およびサービスの詳細についてはウェブサイト (www.agilent.com/chem/jp) をご覧ください。

お問い合わせは： 0120-477-111
横河アナリティカルシステムズ株式会社
〒192-0033 東京都八王子市高倉町 9-1

Agilent は、この文書に含まれる誤りあるいは本資料の提供、履行、使用に関連して生じた付随的または間接的な損害について責任を負いません。

本文書に記載の情報、説明、および仕様は、予告なく変更されることがあります。

© Agilent Technologies, Inc. 2005

Printed in the USA
May 23, 2005
5989-3107JAJP