

「KOD -Multi & Epi-[®]」を用いたDNAメチル化解析

東洋紡（株） 敦賀バイオ研究所 新井 康広

はじめに

エピジェネティクス分野の一つであるDNAのメチル化は癌などの疾患と関わっていることが明らかになり、DNAメチル化解析の重要性が増しつつあります。

DNAのメチル化を解析する手法としてバイサルファイトシーケンス解析が広く使われています。この方法では、バイサルファイト処理により、メチル化されていないシトシン(C)がウラシル(U)に変換される一方で、メチル化されたシトシン(5mC)は変換されないため、PCR後にシーケンス解析を行うことにより、メチル化されたCを区別することができます。しかし、この処理により、ターゲットの配列はATリッチとなり、さらに断片化されるため、一般的にバイサルファイト処理されたDNAの増幅は難しいとされています。

また、KODをはじめとする高正確PCR酵素は、ウラシルを含むテンプレートからの増幅が困難であることが知られており、高正確かつ高効率にバイサルファイト処理後のDNAからターゲット遺伝子を増幅できるPCR酵素が望まれていました。

「KOD -Multi & Epi-[®]」は遺伝子改変型KOD DNA ポリメラーゼ(UKOD)を採用しており、バイサルファイト処理後のDNAのようにウラシルを多く含む鋳型からの増幅効率が大幅に向上しています。(右図)

今回、このような本製品の特長を生かして、培養細胞のメチル化状態を識別した例をご紹介します。

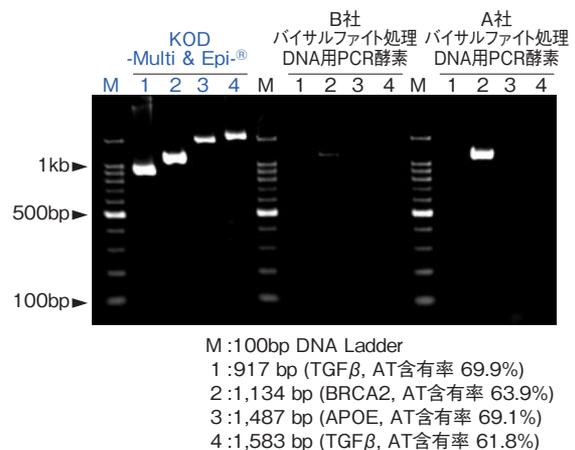


図 バイサルファイト処理DNAの増幅効率の比較

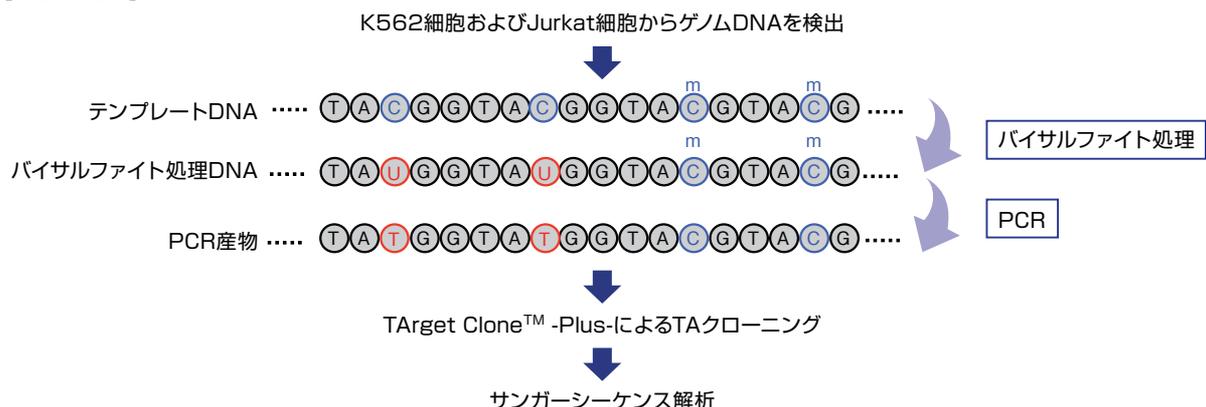
方法

培養細胞のメチル化状態を解析した例として、ヒトCDCP1遺伝子のメチル化状態を検出する文献^{*1}を参考にして、以下の実験の流れでバイサルファイトシーケンス実験を行いました。まず、K562細胞およびJurkat細胞からゲノムDNAを抽出し、EpiTect[®] Fast DNA Bisulfite Kit (QIAGEN社)を用いてバイサルファイト処理を行いました。バイサルファイト処理したゲノムDNAをテンプレートとして、文献記載のプライマー配列でKOD -Multi & Epi-[®]を使用し、次ページに示す反応液組成とPCRサイクルで実施しました。

また、増幅産物に関してクローニングキット(TArget Clone[™] -Plus- Code No.TAK-201)を用いてクローニングした後、得られた各5クローンについてサンガーシーケンス解析を行い、細胞の種類によるメチル化状態の比較を実施しました。

*1 : H Kimura *et al.*, *Leukemia*, **20**, 1551-1556 (2006)

【実験の流れ】



バイサルファイト条件

【バイサルファイト処理方法】

EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit
(QIAGEN社)

【バイサルファイト処理量】

K562 1 µg
Jurkat 1 µg

【バイサルファイト処理DNA】

K562 70.2ng/反応
Jurkat 54.1ng/反応

PCR条件

【プライマー配列】

5'-TAGATTTGGGAAGGAAGATTAAGT-3'
5'-ACAACAACAAACCCCTAACCAATA-3'

【反応液組成】

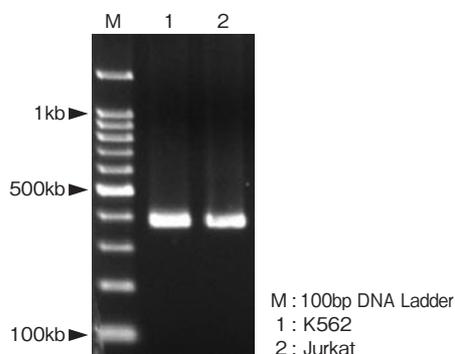
滅菌蒸留水	20 µl
2xBuffer for KOD -Multi & Epi®	25 µl
10pmol/µl Primer Forward	1.5 µl
10pmol/µl Primer Reverse	1.5 µl
バイサルファイト処理DNA	1 µl
KOD -Multi & Epi®	1 µl
Total Volume	50 µl

【PCRサイクル】

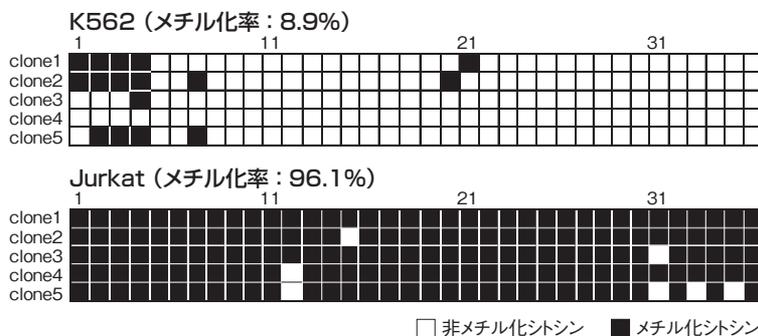
94°C, 2min.	40 cycles
↓	
98°C, 10sec.	
60°C, 30sec.	
68°C, 15sec.	↓
4°C, hold	

結果および考察

【電気泳動結果】



【メチル化解析結果】



解析を行った5クローンについて、増幅領域の36か所のシトシン(C)のみを抜き出し、白四角で非メチル化、黒四角でメチル化シトシンを表しています。

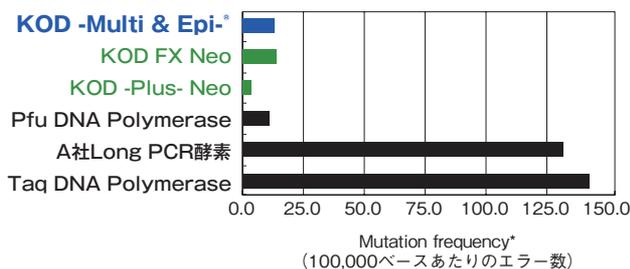
電気泳動結果が示すように、KOD -Multi & Epi®を使用することで、少ないテンプレート量からでも K562およびJurkatの両方とも短時間で効率良くターゲット遺伝子を増幅することができました。また、メチル化解析の結果では、参考とした論文と同様な結果を得ることができました。

まとめ

従来バイサルファイト処理DNAからのPCRは高正確PCR酵素が使えないため、Taq DNA ポリメラーゼが用いられることが多かったのですが、増幅産物にエラーが入るといった難点がありました。

今回、KOD -Multi & Epi®を用いることで効率よく解析を実施できることが示されました。本酵素で増幅したPCR産物は平滑末端となるため通常ではTAクローニングができませんが、専用のキット (Target Clone™ -Plus- Code No.TAK-201) を用いることで容易にTAクローニングを行うことができ、そのクローンをサンガーシーケンスにより解析しました。このような用途においては、PCRの正確性が重要となりますが、本製品は右図に示すようにTaq DNA ポリメラーゼの約11倍の正確性を持つため、最適であると考えられます。

DNAメチル化解析を行う際は、是非一度、KOD -Multi & Epi®をお試しください。



*Mutation frequency は各酵素にてヒトゲノムDNAを鋳型にβ-globin遺伝子(2.4kb)の増幅を行い、PCR産物をTAクローニング後、96クローンについてシーケンス解析を行い、算出しました。

※EpiTect®は、QIAGEN N.V.の登録商標です。