

DS3000 Compact CE Sequencerを用いたバイサルファイトシーケンスの実例

概要

DNAを構成する4つの塩基中、シトシンの5位炭素原子はメチル基転移酵素の働きによりメチル化されることがあります。シトシンのメチル化は遺伝子発現制御をはじめとして、ゲノム上の様々なイベントに重要な役割を持ち、エピジェネティクスにおける代表的なマーカーとして知られています。メチル化されたシトシンを一塩基単位で解析する手法として、バイサルファイトシーケンスがあります。バイサルファイトシーケンスでは、試料から抽出したゲノムDNAを一定時間バイサルファイト(亜硫酸水素塩)で処理します。この時シトシンは脱アミノ化されウラシルに変換されますが、メチル化シトシンは反応せずにそのまま残ります。そのため、反応産物をシーケンスすることで、シトシンとメチル化シトシンを区別することが可能です。ここではDS3000 Compact CE Sequencer(以下、DS3000と表記します)を用いたバイサルファイトシーケンスの実例を紹介します。試料には、HCT116 細胞株由来ゲノムDNAをCpG methylaseにより高度にメチル化した標準サンプルを使用しました。バイサルファイト処理したサンプルをDS3000にて電気泳動し、得られた塩基配列とバイサルファイト処理前の配列を比較しました。その結果、解析対象領域に存在する20個のメチル化シトシンのうち19個を検出できました。



DS3000
Compact CE Sequencer

結果

始めに、HCT116のゲノムDNAをバイサルファイト処理し、精製と定量を行いました。ここでメチル化されていないシトシンはウラシルに変換されます。次に、ヒトMLH1遺伝子の転写開始点上流領域をPCRで増幅しました。このPCR増幅により、ウラシルはチミンに変換されますが、メチル化されたシトシンはシトシンのままとなります。MLH1遺伝子はミスマッチ修復に関連する遺伝子であり、HCT116ではプロモーター部位が強くメチル化されています。次に、得られたPCR産物とBigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied BiosystemsTM) を用いてサイクルシーケンス反応を行いました。サイクルシーケンス反応はフォワードプライマーとリバースプライマーのそれぞれを用いて行いました。最後にそれぞれの反応産物をDS3000で分析しました。得られた結果の一部を図1に示します。ウィンドウ全体で良好な波形が確認されました。波形データの7塩基目にシトシン (C) とチミン (T) の混合塩基 (Y) が認められます。これは、一部のDNA分子に残存したシトシンに由来すると推定されます。次に検出されたメチル化シトシンの位置を図2にまとめました。解析部位には、CpG methylaseの基質となるCpG配列が20個存在します。そのうち、上述の1個を除いた19個においてメチル化シトシンに由来するピークが確認されました。

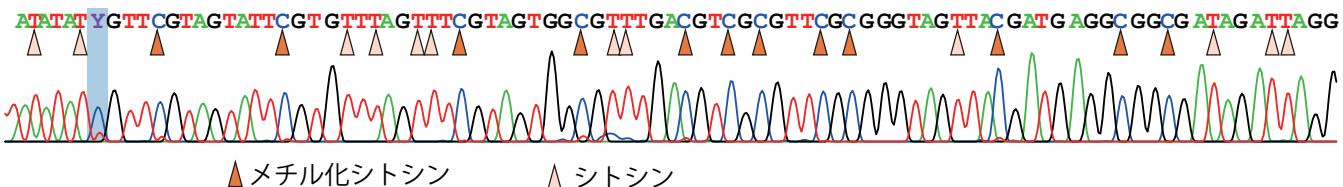


図1:バイサルファイト処理後の代表的な波形データ

フォワードプライマーを用いて得られた波形データを示します。波形データ冒頭の混合塩基(Y)については本文をご参照ください。

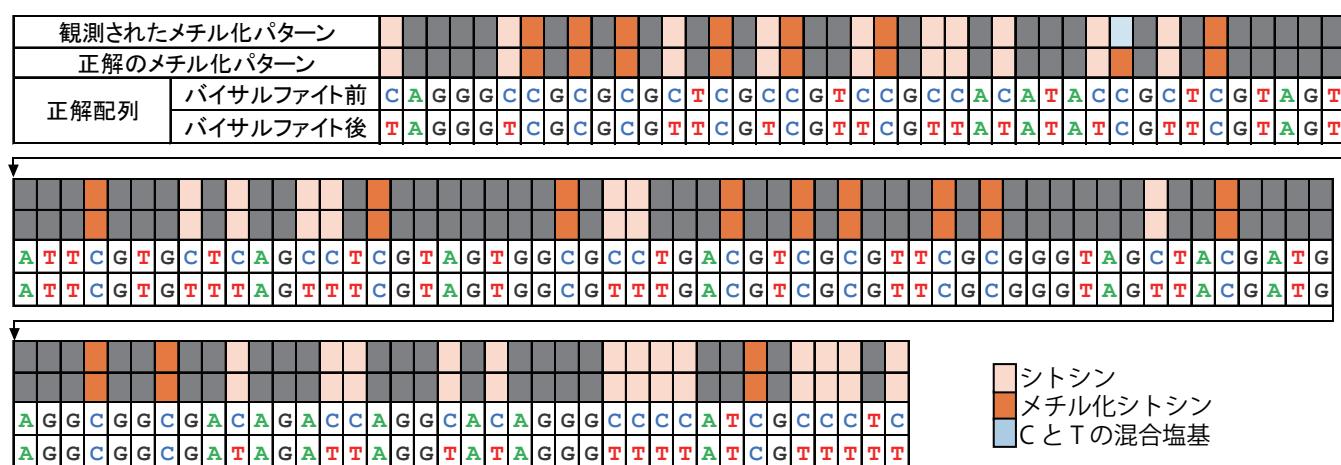


図2:観測されたメチル化シトシンの位置

観測されたメチル化パターンは、フォワードプライマーのデータとリバースプライマーのデータを重ね合わせたコンティグから作成しました。ただし各リードの冒頭40 bases分の塩基配列は除外しています。

結論

ここではDS3000を用いてバイサルファイトシーケンスを行った実例を示しました。ヒトMLH1遺伝子プロモーターを標的に解析したところ、20個中19個のメチル化部位を検出できました。検出できなかった1個は一部のDNA分子に残存したシトシンに由来すると思われます。DS3000にはFast sequencingとStandard sequencingの2種類の電気泳動プロトコルが実装されていますが、どちらのプロトコルでも同様の結果が得られました。

トラブルシュート

バイサルファイト処理後のDNAは1本鎖の形状を取り、極めて不安定ですので取り扱いには十分な注意が必要です。可能な限りサンプルを氷上で保管する、ハンドリングタイムを短くするなどの操作をお勧めします。

実験

バイサルファイト処理は500 ngのEpiScope Methylated HCT116 gDNA(TaKaRa)を用いて、EZ DNA Methylation- Startup™ Kit (Zymo Research) のプロトコルに従って行いました。サンプルは10 μLのElution bufferに溶出し、その内の1 μLを用いてPCRを行いました。PCRはキットに添付のコントロールプライマーを用いて表1～3の条件で行いました。PCR産物はDNA Clean & Concentrator™ -5 (Zymo Research)のプロトコルに従って精製しました。サンプルは10 μLのElution bufferに溶出し、定量の後、200 pgを用いてサイクルシーケンス反応を行いました。サイクルシーケンスはBigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems™)を用いて、添付のプロトコルに従って行いました。反応産物はエタノール沈殿で精製し、10 μLのHi-Di™ formamideに溶解し、Fast SequencingおよびStandard Sequencingで分析しました。全ての電気泳動でSecondary Peak Height Thresholdは25%に設定しました。波形データはSangerSeqR (1) で描画したのち、必要なデータを追記しました。

参考文献

- (1) Hill, J., T., et al. Poly peak parser: Method and software for identification of unknown indels using sanger sequencing of polymerase chain reaction products. Developmental Dynamics. 243, 1632-1636 (2014)

表1:PCRサイクル

温度(℃)	時間(秒)	サイクル
94	600	×1
94	30	
56	30	×35
72	60	
72	420	×1
4		hold

表2:PCRミックス

試薬	液量(μL)
2×ZymoTaq PreMix	12.5
10 pmol/μL フォワードプライマー	2
10 pmol/μL リバースプライマー	2
DNA (約10 ng/μL)	1
PCR grade water	7.5

表3:PCRプライマーの塩基配列

プライマー	塩基配列
フォワード	GGAGTGAAAGGAGGTTACGGGTAAGT
リバース	AAAAACGATAAAACCTATACCTAATCTATC

DS3000の主な仕様

■本体仕様

項目	内容
キャビラリー数	4 本
キャビラリー長	36 cm
サンプルトレイ	8連チューブ×4
装置制御	タッチパネルPC
同時検出	6 色
アプリケーション	シーケンシング解析/フラグメント解析
サイズ	400 (W)×600 (D)×600 (H) mm
重量	45 kg
性能保証温度	15 – 30 °C
性能保証湿度	20 – 80% RH(結露しないこと)
電源	100 – 240 ±10% VAC、50/60 Hz
定格電力	260 VA
対応二次解析ソフトウェア	<ul style="list-style-type: none"> ·Mutation Surveyor (SoftGenetics社製 別売り) ·GeneMarker (SoftGenetics社製 別売り) ·GeneMarker HID (SoftGenetics社製 別売り)

■ランモジュール仕様

ランモジュール	アプリケーション	ポリマータイプ	読み取塩基長 ^{※1} (QV20 CRL)	平均ランタイム (分)
Fast_Sequence36_Polymer7	シーケンシング解析	Polymer7	≥600	≤32
Standard_Sequence36_Polymer7	シーケンシング解析	Polymer7	≥700	≤60
BDx_Fast_Sequence36_Polymer7	BDx シーケンシング解析	Polymer7	≥600	≤32
BDx_Standard_Sequence36_Polymer7	BDx シーケンシング解析	Polymer7	≥700	≤60
ランモジュール	アプリケーション	ポリマータイプ	平均ランタイム (分)	サイジング精度 ^{※2} (50 – 400 bp)
Fragment_Analysis36_Polymer7	フラグメント解析	Polymer7	≤35	NA
Fragment_Analysis36_Polymer4	フラグメント解析	Polymer4	≤44	<0.16

■消耗品仕様

品名	バーツナンバー	内容	備考
Capillary Cartridge 36 cm	613-0330	1個	保管温度:15 – 30 °C
Buffer	613-0252	Anode Buffer Cartridge×2個 Cathode Buffer Cartridge×2個	保管温度: 2 – 10 °C
Polymer7	613-0251	Cartridge×4個	保管温度: 2 – 10 °C
Polymer4	613-0250	Cartridge×4個	保管温度: 2 – 10 °C
Septa for Cathode Buffer Cartridge	613-7231	10個	
Retainer for Cathode Buffer Cartridge	613-7233	4個	
Septa for 8 well tubes	613-7230	24個	
Base and Retainer for 8 well tubes	613-7232	4個	
Anode Electrode Assembly	613-7263	1個	

※1. 読取塩基長(QV20 CRL)はBigDye™ Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit(Thermo Fisher Scientific社製別売り)を用いて検証されています。

※2. サイジング精度(50 – 400 bp)はPowerPlex™ 17 Fast Allelic LadderとWEN ILS 500 ESS(Promega®社製別売り)を用いて検証されています。

- ・研究用にのみ使用できます。診断目的およびその手続き上での使用はできません。
- ・本製品はISO9001、ISO14001認証の日立ハイテク那珂地区において設計・製造されています。
- ・本カタログ中の会社名、商品名は各社の商標および登録商標です。
- ・PromegaはPromega Corporationの登録商標であり、PowerPlexはPromega Corporation の商標です。
- ・本カタログに記載のデータは測定例を示すもので、数値の保証をするものではありません。

◎ 株式会社 日立ハイテク

本社 〒105-6409 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ ビジネスセンター
TEL:(03)3504-5768

E-mail:hhtgene.ai@hitachi-hightech.com

URL www.hitachi-hightech.com/jp/science/

分析機器に関する
各種お問い合わせは…

お客様サポートセンタ (03)3504-7211

受付時間 9:00 ~ 11:50 12:45 ~ 17:30(土・日・祝日および弊社休日を除く)

⚠ 安全に関するご注意

●ご使用の前に「取扱説明書」をよくお読みのうえ正しくご使用ください。

お問い合わせは――

◎ 株式会社 日立ハイテクサイエンス

本社 〒105-6411 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門ヒルズ ビジネスセンター
TEL:(080)1172-7021

URL www.hitachi-hightech.com/hhs/



●このカタログに掲載した製品は、改善のため外観または仕様の一部を予告なく変更することがあります。
●Copyright(C) Hitachi High-Tech Corporation 2022 All rights reserved.