



温度勾配ゲル電気泳動法(TGGE)における泳動条件の検討

白川, 卓
西山, 馨

(Citation)

神戸大学医療技術短期大学部紀要, 9:119-124

(Issue Date)

1993

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/80070242>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/80070242>



温度勾配ゲル電気泳動法 (TGGE) における泳動条件の検討

白 川 卓, 西 山 馨

緒 言

既に、著者らは、比較的簡便な装置で構成される温度勾配ゲル電気泳動 (TGGE) の技法によって遺伝子分析が可能であることは報告した¹⁾。TGGE法²⁾は、遺伝子異常のスクリーニング法の優れた方法として注目されつつある。しかし、このTGGE法を再現性良く行なうには、泳動条件に種々の工夫と注意が必須である。今後のTGGEの臨床応用への早期適用に向けて当然解決しなければならない問題点とも言える検討項目であるので、これらをまとめて報告する。

材料と方法

1 プライマーの合成と精製

ETEC-LT A サブユニットをコードするDNA領域を増幅する3種のプライマー (1L:5'-CGCCATTATATGCAAATGGCG-3', 1R:5'-GTCAACCTCTGACTGATAGTC-3', および 2L:5'-CACCAAGCTTGGAGAGAAGAA-3') をDNA自動合成機 (Model 392 DNA/RNA Synthesizer, Applied Biosystems) で合成した。その一部について、TSKgel Oligo-DNA RPカラム (4.6×150mm, 東ソー製) を装着した日本分光製HPLCシステムを用いて、アセトニトリルと0.1M酢酸アンモニウム緩衝液 (pH7.0) の混合液を溶離液とし、組成を10/90から25/75への20分間直線濃度勾配溶出法により室温で分離した。流速は1.0ml/minで、260nmの紫外吸

収により検出した³⁾。

2 DNAの調製およびPCR

ETEC B₂C株 (神戸市環境保健研究所から分与) および3株のETEC臨床分離株 (大阪空港検疫所から分与) はいずれも前報¹⁾で検討した株で、これらをKado法⁴⁾で処理し、Plasmid DNAを抽出した。PCR法も前報^{1), 5)}の方法によった。

3 ポリアクリルアミドスラブゲルの調製とTGGE

8M尿素, 2%グリセリンおよび20mM MOPSバッファー (pH8.0) を含む6%あるいは8%ポリアクリルアミドスラブゲル (130×160×1mm) を作製した。また、試料孔の約10mm下方まで前述のアクリルアミドモノマーを流し込み、ゲル化させた後、尿素およびグリセリンを含まないアクリルアミドモノマーを重ねてゲル化させたスタッキングゲルを作製した。TGGEの基本的な実験法は前報¹⁾の方法によった。泳動後のDNAの検出は銀染色法²⁾で行なった。

結 果

ゲル面の乾燥に対処するために、まず、試料孔の位置に約5mm幅の穴をあけたアクリル薄板 (130×160mm) をゲル面にのせ、10分間程度予備泳動した。その後、試料を添加し、再び泳動して指示用色素の後端が2~3mm程度泳動した後、アクリル薄板の小片 (130×10mm) で試料孔近辺を完全に覆い、ゲルの乾燥を防いだ。尿素などのDNA変性剤を添加した場合、DNAの

変性融解温度 (T_m) を低下させることができる。前報では、尿素を添加していなかったので 40~85℃ の温度勾配で泳動したが、今回、高濃度の尿素を添加した結果、30~70℃ の温度勾配での分析が可能になり、温度勾配の低温化によってゲルの乾燥を幾分抑えることができた。

タイテック社製の TGGE 用 アクリルアミドスラブゲル作製器でスラブゲルを作製した場合、しばしば、試料孔 (ウェル) の周辺にゲル小片の付着が認められた。これは試料孔作製のアクリル樹脂とガラス板の穴とのわずかな間隙が原因である。ゲル小片の付着があると、添加した試料が隣の試料孔に回り込むことによって明瞭な泳動結果が得られないので、これらの小片は丁寧にテフロンピンセットで取り除いた。また、高濃度の尿素を添加したアクリルアミドスラブゲルの場合、予備泳動中に試料孔近辺からの尿素的の滲出によって、スークロースを加えた試料でもうまく添加できないというトラブルを、しばしば経験した。今回、試料孔近辺の尿素を除いたスタッキングゲルを作製したことによって、これらのトラブルを解消することができた。

泳動バッファの選択によって TGGE の温度勾配の設定だけでなく泳動パターンの再現性は大きく左右された。実際、前報で用いた 1 × TBE あるいは 0.1 × TBE バッファでは、8 M 尿素を添加した場合でも、泳動パターンの再現性が乏しいのが懸念されたが、使用バッファを 20 mM MOPS バッファに変更することによって、図 1 に示すように再現性の良い、乱れない明瞭な結果を得ることができた。前報のヘテロ鎖分析では、PCR 産物を別にサブマリン電気泳動などで精製し、回収した後、アニーリング反応液 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5-100 mM NaCl-2.5 mM EDTA) 中で異種 DNA のアニーリングを行い、ヘテロ鎖とホモ鎖を検出していた。図 1 では、PCR 後の反応液を直接混合してアニーリングし、ヘテロ鎖分析した結果を示した。すなわち、1 L-1R のプライマーセットによる反応生成物 (707 bp の DNA 断片に相当) をアニーリング後、8 M 尿素および 2 % グリセ

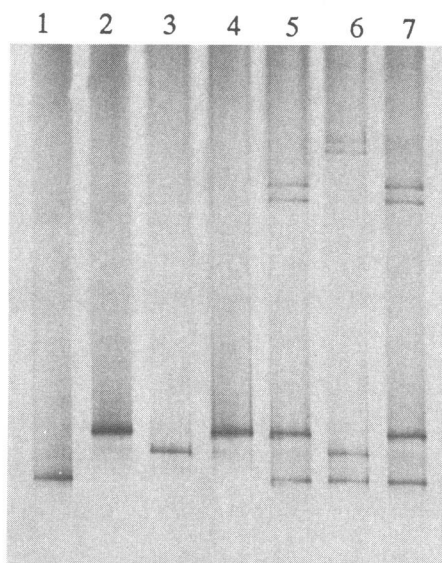


図 1 1 L-1R プライマーセットを用いた水平 TGGE 法によるホモ鎖およびヘテロ鎖の分析 (8 M 尿素および 2 % グリセロールを含む 6 % アクリルアミドスラブゲル)

レーン 1 : B₂C 株ホモ鎖

レーン 2~4 : 臨床分離株ホモ鎖

レーン 5~7 : B₂C 株と臨床分離株ヘテロ鎖
(TGGE の詳細は実験方法あるいは前報¹⁾を参照)

ロールを含んだ 6 % ポリアクリルアミドスラブゲルで 250 V, 180 分間泳動した結果である。この図でも明らかなようにヘテロ鎖の上方に帯状に濃く染色される不純成分とヘテロ鎖あるいはホモ鎖とは明確に分離した。これらのヘテロ鎖とホモ鎖の泳動位置はサブマリン電気泳動で精製した場合と一致した。精製操作とアニーリング用反応液での反応という面倒な操作をスキップしたことによって、十分量の分析用試料が確保でき、明瞭で再現性のある泳動パターンが得られた。

次に 2 L-1R プライマーセットによって増幅される 183 bp の DNA 断片のヘテロ鎖分析の結果を図 3 に示した。2 L および 1 R の合成プライ

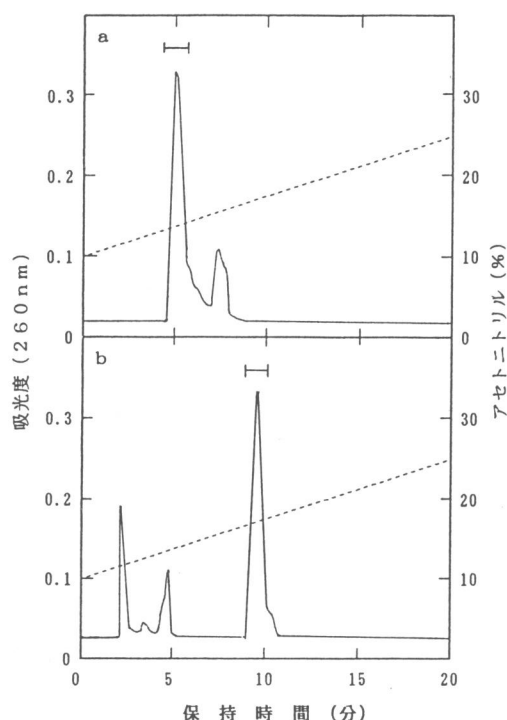


図2 TSKgel Oligo-DNA RPカラムを用いた高速液体クロマトグラフィーによる合成プライマーの分画

a) 2 L, b) 1 R

— 吸光度 --- アセトニトリル濃度 (%)

マーをHPLCによって精製した場合、それぞれ、2本と4本のピークに分離された(図2 a, b)。それぞれのメインピーク(図のバー部分)を回収してPCR反応に用いた後、6 M尿素および2 %グリセロールを含んだ8 %ポリアクリルアミドスラブゲルで250V, 180分間泳動したTGGEによるヘテロ鎖分析の結果を図3 bに示した。精製プライマーを用いた場合、未精製のプライマーの場合(図3 a)よりも、ホモ鎖とヘテロ鎖のバンドは幾分、明瞭であった。また、TGGEに要する分析時間の短縮化のため500Vの定電圧で90分間泳動したが、不明瞭な再現性の乏しい結果になる傾向が認められた(図3 c)。泳動時間はほぼ2倍かかるが、250V程

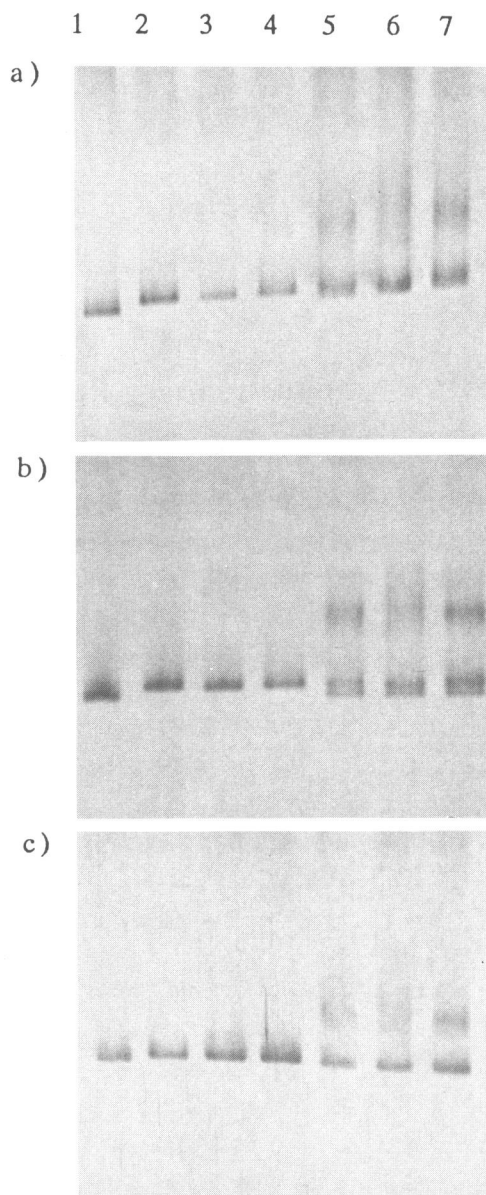


図3 2L-1Rプライマーセットを用いた水平TGGE法によるホモ鎖およびヘテロ鎖の分析(6 M尿素および2 %グリセロールを含む8 %アクリルアミドスラブゲル)

a) 未精製プライマー, 250V (180分)

b) 精製プライマー, 250V (180分)

c) 精製プライマー, 500V (90分)

(各レーンの試料については、図1と同一)

度の低電圧で泳動した場合の方が再現性の良好な結果が得られ、バンドも明瞭であった。また、TGGE法で分析した図1と図3の泳動パターンを単純に対比することは早計かもしれないが、PCR産物としては比較的長鎖に類する707bpのDNA断片の方が、短鎖に類する183bpのDNA断片よりも、ホモ鎖の移動度の差異は明瞭であった。

考 察

著者らは、TGGEを検討し始めて半年を経過しても、それらの結果の再現性に悩まされ続けたが、次第に精通し、解決策が見えてきた。電気泳動については通電中の乾燥と試料の添加について万全の注意を払うことである。従来の電気泳動法はできるだけ泳動面を低温にしてジュール熱の発生によるスマイリングを抑える方法が取られてきた。しかし、温度勾配ゲル電気泳動(TGGE)においては、一方のゲル端を85℃の高温にさらすこともある^{2, 6)}ので、泳動中のゲル面の乾燥について、特に注意する必要がある。著者らは、ブリッジからゲル表面までの全面をラップとアクリル薄板で覆い、250V程度のできるだけ低電圧で通電し、高濃度の尿素を加えたアクリルアミドスラブゲルの使用によって、良好な再現性を得ることに成功した。今回のようにバッファの交換が有効な場合もあるので、歪な泳動パターンの時はバッファについて吟味するのも有効である。試料添加時のトラブルは、完全な試料孔(ウェル)ができておれば、ほとんど発生しない。面倒でも注意して試料孔近辺を点検することが必須である。

一方、TGGEの前段の操作ではPCRとアニーリングが重要である。最近、PCRに使用されるプライマーは、ほとんど、合成装置で合成した20塩基程度のオリゴヌクレオチドを精製せずに使用している。今回、未精製オリゴヌクレオチドを用いてTGGEを行なった実験でも、それらのTGGEの結果を見誤ることはなかった。しかし、未精製プライマーでは若干の鎖長の差に

よって、TGGEのバンド幅がブロードになる。泳動距離の差が僅小の場合には、TGGEの判定が困難になることも予想されるので一般的には、プライマーは精製した後に使用すべきと考えられる。アニーリングについては、特に、アニーリング反応溶液中でアニーリングする必然性もなかった。PCR産物の鎖長については100～500bpが良いと言われているが⁶⁾、今回のTGGEの実験結果では、比較的長いDNA断片に属する707bpのDNA断片の方が、183bpのDNA断片より明瞭なバンドが認められた。これはDNA断片の協同的融解領域の位置や大きさにも関係しており、長鎖の方が良い結果を得ることもあることを示している。

結 語

- 1 ゲル面の乾燥と試料添加に注意をはらい、20mM MOPSバッファ、250Vの電圧、尿素添加などの泳動条件でTGGEの良好な泳動パターンを得た。
- 2 プライマーセットの高速液体クロマトグラフィーによる精製操作によって明瞭な泳動パターンを得た。
- 3 アニーリング操作はPCR反応物を直接用いても、泳動パターンには影響はなかった。

文 献

1. 白川 卓, 西山 馨: 温度勾配ゲル電気泳動による遺伝子変異の検出 神大医短紀要8:69, 1992.
2. Rosenbaum V and Riesner D: Temperature-gradient Gel Electrophoresis: Thermodynamic Analysis of Nucleic Acids and Proteins in Purified Form and in Cellular Extracts. *Bioph. Chem.* 26:235, 1987.
3. Moriyama H and Kato Y: New reversed-phase high-performance liquid chromatographic column for oligonucleotide separation. *J. Chromatography* 445:225, 1988.

4. Kado CI and Lui ST: Rapid procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. J. Bacteriol. 145:1365, 1981.
5. 白川 卓, 西山 馨: 次亜塩素酸ナトリウムによる核酸の分解—PCR反応時のコンタミネーション除去への利用—神大医短紀要 7:17, 1991.
6. タイテック実験マニュアル集, TGGE編, タイテック社, No.1～6, 1992.

Studies on Conditions in Temperature Gradient Gel Electrophoresis

Taku Shirakawa and Kaoru Nishiyama

ABSTRACT : To obtain constant data in experiments of Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE), attention to the dryness of gel and sample-loading on electrophoresis was paid strictly. And then, the electrophoresis was performed with 6 or 8% acrylamidegel slab (130×160×1mm) consisting of 20mM MOPS buffer (pH8.0), 2 % glycerol and 8M urea. By these improvements, the electrophoretic patterns of TGGE were clearer and reproducible. PCR-products without the replacement to the annealing buffer could be used directly. The synthetic oligonucleotide primer was purified by the high pressure liquid chromatography equipped with TSKgel Oligo-DNA RP column (4.6×150mm) . When each purified primer-set was applied to TGGE, their electrophoretic patterns were clearer.

Key Words: Temperature Gradient Gel Electrophoresis,
High Pressure Liquid Chromatography,
Annealing,
Polymerase Chain Reaction,
Mutation