

I. DNA メチル化解析

DNA メチル化解析手法は、(A) メチル化 DNA を濃縮する方法、(B) バイサルファイト処理による塩基置換を利用する方法、(C) メチル化感受性の制限酵素を利用する方法の 3 種類に分類されます。新規ターゲットのスクリーニングには(A)の手法が、個別ターゲットの詳細な解析には(B)や(C)の手法がよく用いられています。

A. メチル化 DNA の濃縮

- ◆ゲノムワイドに DNA メチル化領域を濃縮
- ◆新規ターゲットのスクリーニングに

【1】原理

[EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit](#) では、メチル化 CpG に結合するタンパク質 (MBD2) を利用して DNA メチル化領域を濃縮します。まず、試料からゲノム DNA を抽出し、適当なサイズ*に断片化します。次に、予め磁性ビーズに結合させた MBD2 とゲノム DNA を混合し、メチル化 DNA を結合させます。その後、塩によりメチル化 DNA を溶出しますが、塩濃度の調整により、CpG メチル化頻度に応じメチル化 DNA を分画することも可能です。

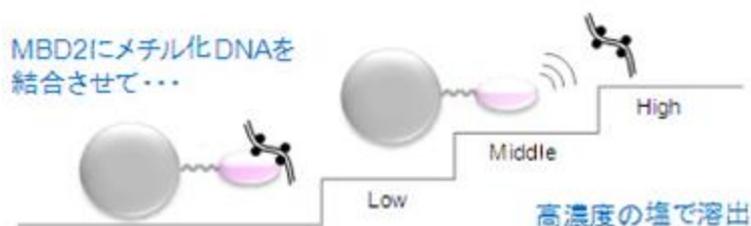
* その後の解析手法により、最適な断片化サイズは異なります。リアルタイム PCR には 200~800 bp 程度、マイクロアレイには 200 ~600 bp 程度、高速シーケンス解析には 200 bp 前後が最適です。

【Step1】ゲノムDNAの抽出&断片化



【Step2】DNAメチル化領域の濃縮

EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit



【Step3】濃縮産物の解析

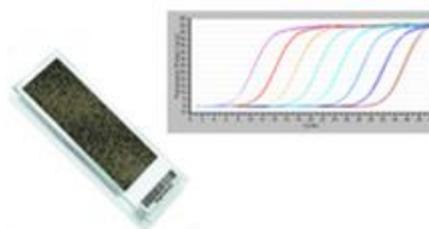
リアルタイムPCR

・TB Green® Premix Ex Taq™ GC

マイクロアレイ

高速シーケンス

・受託サービス



【2】プロトコール

以下は、大まかな実験の流れです。操作方法の詳細は、該当製品の説明書などをご参照ください。

(1) ゲノム DNA の抽出

[NucleoSpin® Tissue](#) によりゲノム DNA を抽出する（「4. 各解析に共通の試薬・キット」参照）。ゲノム DNA の必要量は、メチル化 DNA 濃縮後の解析手法によって異なるが、EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit による 1 回の濃縮には、約 1 μ g のゲノム DNA を使用する。

(2) ゲノム DNA の断片化

- 1) ゲノム DNA (2~10 μ g 程度) を TE 300 μ l に溶解する
- 2) 超音波破砕機を用いて適当なサイズ (200~800 bp) に断片化する
 - ✓ 超音波破砕の条件は、予備実験により決めておく。
 - ✓ 超音波破砕は、温度上昇を防ぐため、チューブを氷上に立てて行う。
- 3) アガロース電気泳動により断片化した DNA のサイズを確認する
- 4) 断片化 DNA をエタノール沈殿により濃縮し、滅菌水に溶解する
 - ✓ DNA の濃度を測定し、必要に応じて適当な濃度に調整する。

(3) EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit によるメチル化 DNA の濃縮

(操作方法の詳細は、本キットのユーザーマニュアルをご参照ください。)

1) ビーズの洗浄

TALON®磁性ビーズを分注し、1×Binding/Washing Buffer で 2 回洗浄後、1×Binding/Washing Buffer に懸濁する

2) MBD2 と TALON®磁性ビーズの結合

1. 洗浄済みビーズに MBD2 タンパク質を添加する
2. 室温で 1 時間、ローテーターで混合する
3. ビーズを 1×Binding/Washing Buffer で 3 回洗浄後、1×Binding/Washing Buffer に懸濁する

3) メチル化 DNA と MBD2 の結合

1. MBD2 を結合させたビーズに断片化した DNA を添加する
2. 室温で 1 時間、ローテーターで混合する
3. 上清を新しいチューブに回収する (非結合画分)
4. ビーズを 1×Binding/Washing Buffer で 2 回洗浄する

4) メチル化 DNA の溶出

1. ビーズを Elution Buffer に懸濁する
 2. 上清を新しい 1.5 ml チューブに回収する (溶出画分)
 3. 1~2 のステップを 1 回繰り返す
- ✓ 塩濃度の異なる 3 種類の Elution Buffer (Low, Middle, High) を順に使用すると、CpG メチル化頻度に応じメチル化 DNA を分画できる。分画の必要がない場合は、Elution Buffer (High) だけを使用する。

5) エタノール沈殿

1. 各回収画分に Gen とるくん™エタ沈キャリアを添加して、エタノール沈殿を行う
2. 70%エタノールでリンスする
3. 沈殿を乾燥させ、適当量 (20~40 μ l) の TE に溶解する

【3】 実験例

HeLa S3 細胞、A549 細胞 各 2×10^6 個からゲノム DNA を抽出し、得られたゲノム DNA の内、 $12 \mu\text{g}$ を超音波破砕機 (Covaris) で断片化した。次に、EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit によりメチル化 DNA の濃縮を行い、約 90 ng の DNA が得られた。その一部を鋳型とし、3 種類の遺伝子の転写開始点上流付近を対象として、リアルタイム PCR を行った。

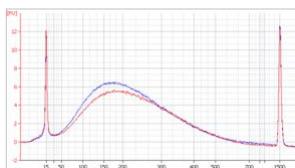


図 1. 断片化ゲノム DNA を Agilent 2100 Bioanalyzer で解析した結果
主に 100~300 bp のサイズに断片化されていた。



図 2. EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit による濃縮物をリアルタイム PCR で解析した結果
非結合画分、溶出画分の DNA をリアルタイム PCR で解析し、各画分の定量値をパーセンテージで表した (青：非結合画分、赤：溶出画分)。各細胞で異なる領域の DNA 濃縮が確認され、これらの遺伝子領域の DNA メチル化状態に違いがあることが示唆された。

【4】 製品リスト

[NucleoSpin® Tissue \(製品コード 740952.10/.50/.250\)](#)

[EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit \(製品コード 631963、631962\)](#)

a. リアルタイム PCR

- ◆メチル化 DNA 濃縮や ChIP 後の特定領域の解析に
- ◆GC 含量の高い配列には専用のリアルタイム PCR 試薬を

【1】原理

EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit やクロマチン免疫沈降で目的の DNA 画分を濃縮した後、特定の遺伝子領域の定量をするにはリアルタイム PCR が用いられます。解析結果は、濃縮前 (Input) の量に対する濃縮後のパーセンテージ、または非結合画分と結合画分の割合等で表わされます。

・GC リッチターゲットに適したリアルタイム PCR 試薬

エピジェネティクスの解析では、多くの場合、転写開始点上流域が対象となりますが、この領域には CpG アイランドが存在し、配列の GC 含量が非常に高いことがあります。そのような配列には、GC 含量 60~70%でも精度の高い定量が可能な [TB Green® Premix Ex Taq™ GC \(Perfect Real Time\)](#)がお勧めです。また、GC 含量が 70%を超える場合には、[MightyAmp™ for Real Time \(TB Green® Plus\)](#)をお試しください。

【2】プロトコール

(操作方法の詳細は、各製品の説明書をご参照ください。)

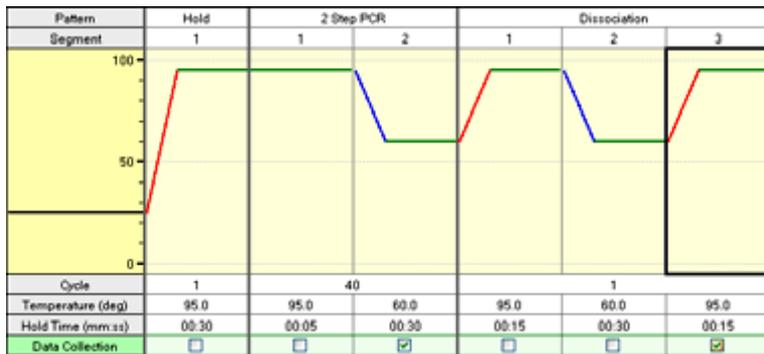
(1) 以下の反応液を調製する

試薬	使用量	最終濃度
TB Green® Premix Ex Taq™ GC (2×)	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM *1
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM *1
Template DNA	2.0 μl	*2
滅菌精製水	9.5 μl	*2
Total	25.0 μl	

*1 最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題がある時は 0.1~1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

*2 DNA 濃度によって適宜調整可能。濃縮前のゲノム DNA 相当量で、20~100 ng 程度を用いると良い。

(2) 以下のプログラムでリアルタイム PCR を行う



Hold (初期変性)
 Cycle : 1
 95°C 30 秒
 2 Step PCR
 Cycle : 40
 95°C 5 秒
 60°C 30 秒
 Dissociation

【3】 実験例

HeLa S3 細胞、A549 細胞から抽出したゲノム DNA を断片化し、各 1.5 μg を EpiXplore™による DNA メチル化領域の濃縮に用い、最終的にそれぞれ 45 μl の非結合画分 (FT) および結合画分 (EL) の濃縮物を得た。1 反応あたり 1 μl の濃縮物を鋳型として使用し、各遺伝子の promoter 領域のプライマーを利用して、TB Green® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time)を用いてリアルタイム PCR を行った。



図 3. ヒトの各遺伝子のメチル化解析の結果

EpiXplore™の非結合画分および結合画分の DNA をリアルタイム PCR で解析し、各画分の定量値をパーセンテージで表した (青: 非結合画分、赤: 結合画分)。いくつかの遺伝子において、細胞の種類により濃縮度合いが大きく異なることが確認され、これらの遺伝子の転写開始点上流付近の DNA メチル化状態に違いがあることが示唆された。なお、A549 の CDKN2A と CDKN2B は、非結合画分、結合画分ともに検出されなかった。

【4】 製品リスト

- [NucleoSpin® Tissue \(製品コード 740952.10/.50/.250\)](#)
- [EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit \(製品コード 631963、631962\)](#)
- [TB Green® *Premix Ex Taq*™ GC \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR071A/B\)](#)
- [MightyAmp™ for Real Time \(TB Green® Plus\) \(製品コード R075A/B\)](#)

b. マイクロアレイ解析

◆メチル化 DNA 濃縮や ChIP 後のゲノムワイドな解析に

【1】原理

EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit やクロマチン免疫沈降で目的の DNA 画分を濃縮した後、マイクロアレイによりゲノムワイドな解析を行います。解析結果は、濃縮前 (Input) の DNA 量に対する濃縮後の DNA 量の比率として表されます。

【Step1】

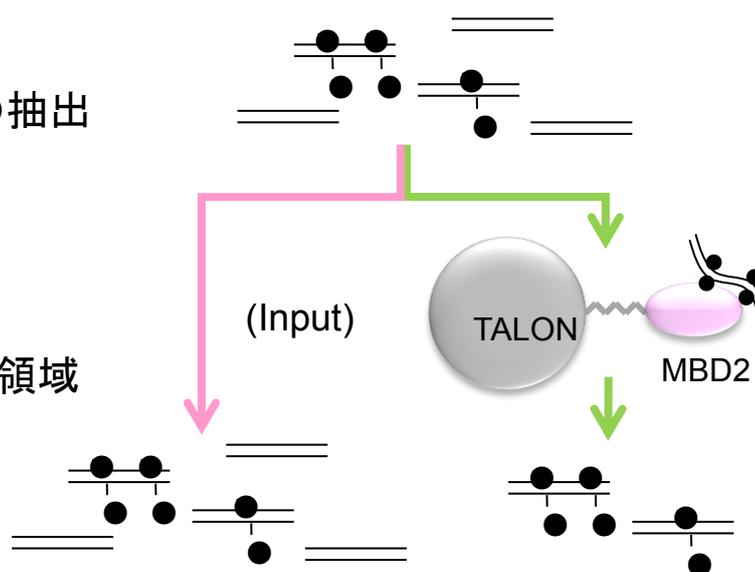
ゲノム DNA の抽出
& 断片化

【Step2】

DNA メチル化領域
の濃縮

【Step3】

マイクロアレイ解析



【2】実験例

HeLa S3 細胞、A549 細胞から抽出したゲノム DNA を断片化し、各 12 μ g を EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit による DNA メチル化領域の濃縮に用い、最終的に約 90 ng の濃縮物を得た。その内、70 ng を用いて whole genome amplification を行い、定法に従いラベリングした。また、コントロールとして EpiXplore™ による濃縮前の断片化ゲノム 70 ng を同様の手法にてラベリングした。濃縮前/後のラベリングした DNA を Agilent Human CpG Island Microarray 上で競合ハイブリさせた。

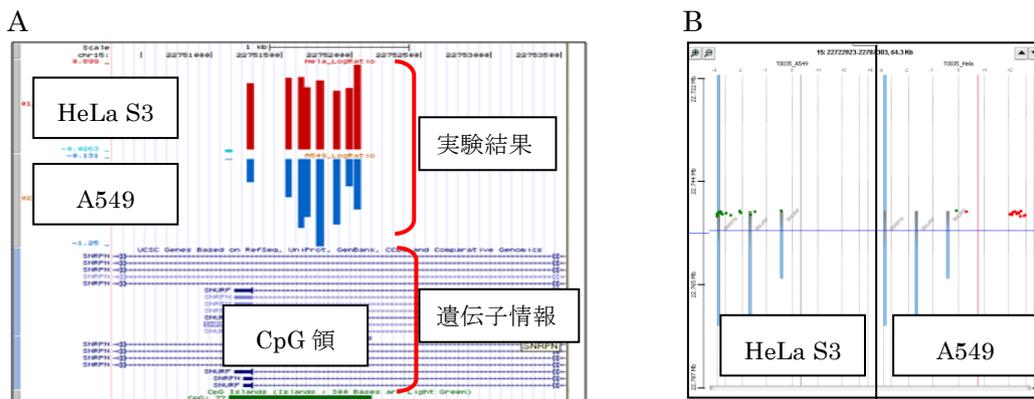


図 4. Agilent Human CpG Island Microarray 解析結果

A) UCSC Genome Browser に解析データを投入し、各領域の濃縮前/後の DNA 量存在比を Bar グラフとして表示した。赤い Bar は濃縮後の DNA 量が濃縮前の DNA 量より多いことを示し、青い Bar は濃縮前の DNA 量が濃縮後の DNA 量より多いことを示している。

B) Agilent Genomic Workbench 5.0 に解析データを投入し、各領域の濃縮前/後の DNA 量存在比をプロットした。青い線は遺伝子情報、赤いプロットは濃縮後の DNA 量が濃縮前の DNA 量より多いことを示し、緑のプロットは濃縮前の DNA 量が濃縮後の DNA 量より多いことを示している。

【3】製品リスト

[NucleoSpin® Tissue \(製品コード 740952.10/.50/.250\)](#)

[EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit \(製品コード 631963、631962\)](#)

c. MeDIP-Seq/hMeDIP

- ◆抗メチル化シトシン抗体/抗ヒドロキシメチル化シトシン抗体を用いてメチル化領域を濃縮
- ◆ゲノムワイドにメチル化領域を解析

【1】原理

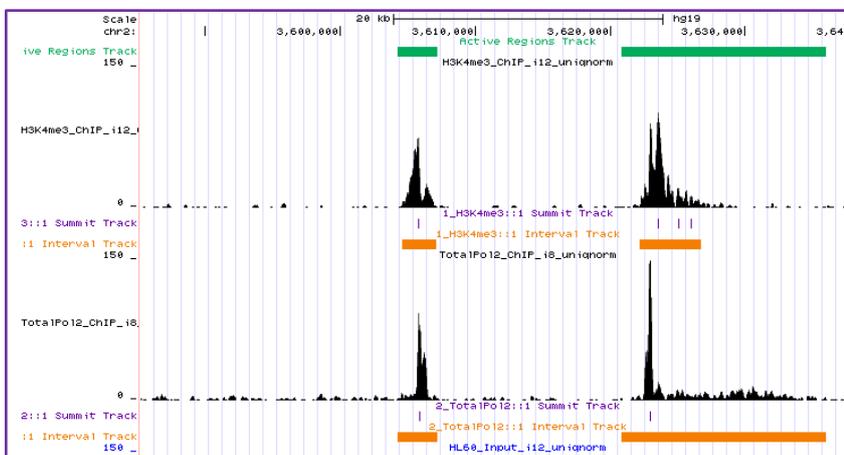
抗メチル化シトシン抗体（または抗ヒドロキシメチル化シトシン抗体）を用いて DNA メチル化領域を濃縮します。細胞や組織からゲノム DNA を抽出し、DNA を断片化します。次に、抗メチル化シトシン抗体とゲノム DNA を混合し、メチル化 DNA を結合し、メチル化 DNA 領域を免疫沈降にて濃縮します。免疫沈降にて取得した DNA を次世代シーケンサーにてシーケンスを行います。シーケンスリードを参照配列にマッピングし、メチル化領域を検出します。

【2】受託サービスのご案内

細胞または組織でご送付ください。経験豊富な Active Motif 社にて ChIP 反応より実施いたします。調整した ChIP 産物をイルミナ社シーケンサーでシーケンスを行います。シーケンスリードを参照配列にマッピングし、リードが集中するエンリッチ領域を検出し（ピークコール）、アノテーション情報を付加したリストを作成します。

クロマチン免疫沈降サンプルの解析 (ChIP-seq)

<納品データ例：ピークコール結果、アノテーションリスト結果>



Active Region	Chromosome	Start	End	Length	Interval Count	sample1 Avg Value	sample2 Avg Value	sample1 Peak Value	sample2 Peak Value
1	1	712,400	715,599	3,199	3	10.548	14.776	51	22
2	1	761,200	763,199	1,999	2	9.167	7.432	29	22
3	1	839,684	843,599	3,915	2	5.284	5.516	22	22
4									

CGIsland Count	Promoter Count	Gene Count	Gene List	Distance to Start	Position	UCSC Link	sample1 Presence
1	2	2	LOC100288069, LOC100288069	169, -7321	in gene, upstream	ActReg chr1	
1	3	4	FAM87B, NCRN, FAM87B, NCRN	9448, 703, -	downstream, in gene	ActReg chr1	
1	1	2	LOC284600, FLJ12946	-5174, 1317	upstream, downstream	ActReg chr1	
1	2	3	LOC284600, FLJ12946, LOC284600	12946, -494	downstream, upstream	ActReg chr1	