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。

B. バイサルファイト処理

◆非メチル化シトシンをウラシルに変換

◆特定領域の DNA メチル化解析に

【1】原理

バイサルファイト処理を行うことで、DNA 中のメチル化されていないシトシン（非メチル化シトシン）はウラシルに変換されます。一方、メチル化シトシン（5mC）はバイサルファイト処理では変換されないため、本処理を行うことでメチル化シトシンと非メチル化シトシンを区別することができます。処理後、非メチル化 DNA とメチル化 DNA は異なる塩基配列を持つことになり、PCR 増幅後にシーケンス解析や制限酵素処理などの方法で DNA メチル化解析を行うことができます。

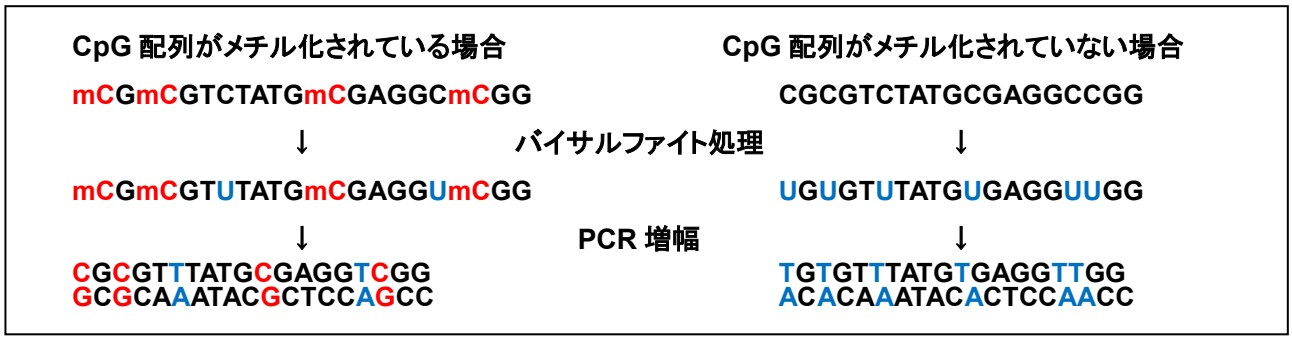


図１．　バイサルファイト処理とPCR増幅

【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。
（2）　バイサルファイト処理
（3）　バイサルファイト処理済み DNA の精製
（4）　脱スルホン酸処理
　　95℃で 20 分間、インキュベートし、脱スルホン酸処理を行う。

【3】実験例

5 つのゲノム DNA 領域につき、96 クローンのバイサルファイトシーケンス解析を行い、その結果から CpH の変換効率を求めた。どの領域も 99%前後の高い効率で変換されており、合計では 99.07%の変換効率であった。

（実験手法の詳細は、「d. バイサルファイトシーケンス解析」の項をご参照ください。）

解析領域	“C”総数	未変換”C”	変換率（%）
1	10,481	87	99.17
2	16,723	95	99.43
3	16,566	106	99.36
4	23,490	273	98.84
5	19,136	241	98.74
合計	86,396	802	99.07

本解析は、京都大学 iPS 細胞研究所より
ご依頼いただきました。

下記の項目もご参照ください。

d. バイサルファイトシーケンス解析

e. MSP (Methylation Specific PCR)

f. COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)

【4】製品リスト

NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10/50/250）

d. バイサルファイトシーケンス解析

◆バイサルファイト処理済み DNA のシーケンス解析

◆特定領域の DNA メチル化を一塩基の解像度で解析

【1】原理

バイサルファイト処理後に、解析目的のゲノム DNA 領域を PCR 増幅し、クローニングしてシーケンス解析を行います。

・TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA)

バイサルファイト処理後の PCR には、TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA) をお勧めします。バイサルファイト処理した DNA にはウラシルが含まれており、α型の DNA ポリメラーゼでは効率良く増幅することができませんのでご注意ください。

【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） ゲノム DNA の抽出

NucleoSpin® Tissue によりゲノム DNA を抽出する。

（２） バイサルファイト処理

（３） TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA) による PCR 増幅

1）以下の反応液を氷上で調製する。

試薬	使用量	最終濃度
TaKaRa EpiTaq HS (5 units/μl)	0.25 μl	1.25 units
10× EpiTaq PCR Buffer (Mg^{2+} free)	5 μl	1×
25 mM $MgCl_2$	5 μl	2.5 mM
dNTP Mixture (2.5 mM each)	6 μl	0.3 mM each
Forward Primer (20 μM)	1 μl	0.4 μM
Reverse Primer (20 μM)	1 μl	0.4 μM
DNA	<100 ng	
滅菌精製水	Up to 50 μl	

2）以下の条件で PCR 増幅を行う。

98℃　10 秒
55℃　30 秒
72℃　30 秒～1 分 *1
（30～40 サイクル）*2

*1　伸長反応時間は、1 kb/1 分を目安に設定する。増幅効率が悪い場合は、時間を延長すると改善することがある。

*2　増幅量が少ない場合は、サイクル数を増やす。

3）アガロース電気泳動により増幅産物を確認する。

（４） DNA Ligation Kit ＜Mighty Mix＞によるクローニング

1） プラスミドベクターおよび PCR 産物を含む DNA 溶液 5～10 μl を用意する。
2） 1）の DNA 溶液と等量の Ligation Mix (5～10 μl) を添加し、よく混合する。
3） 16℃で 30 分間、保温する。
4） 100 μl のコンピテントセルに 10 μl の反応液を加え、形質転換を行う。
5） 形質転換後、37℃にて一晩培養する。

（５） シーケンス解析

24 個以上*3 のクローンについて、定法によりシーケンス解析を行う。

*3　正しい解析結果を得るには、多数のクローンについてシーケンス解析を行う必要がある。定性的な解析の場合にも、少なくとも 24 個以上のクローンの解析を行うことが望ましい。

【3】製品リスト

NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10/50/250）

TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA)（製品コード R110A/B）

DNA Ligation Kit ＜Mighty Mix＞（製品コード 6023）
TaKaRa T-Vector pMD20（製品コード 3270）
E. coli HST08 Premium Competent Cells（製品コード 9128）
EpiScope® Methylated HeLa gDNA（製品コード 3520）
EpiScope® Methylated HCT116 gDNA（製品コード 3522）
EpiScope® Unmethylated HCT116 DKO gDNA（製品コード 3521）

e. Methylation Specific PCR (MSP)

◆メチル化／非メチル化 DNA 特異的 PCR
◆多検体の解析や微量メチル化 DNA の検出に最適

【1】原理

バイサルファイト処理により CpG 配列のメチル化状態に応じて配列が変化する箇所にメチル化 DNA 検出用と非メチル化 DNA 検出用のプライマー（M primer および UM primer）を設計し、PCR 増幅を行います。エンドポイント検出の PCR を行う場合は、電気泳動で増幅の有無を確認します。リアルタイム PCR ではメチル化 DNA の半定量的な解析も可能です。

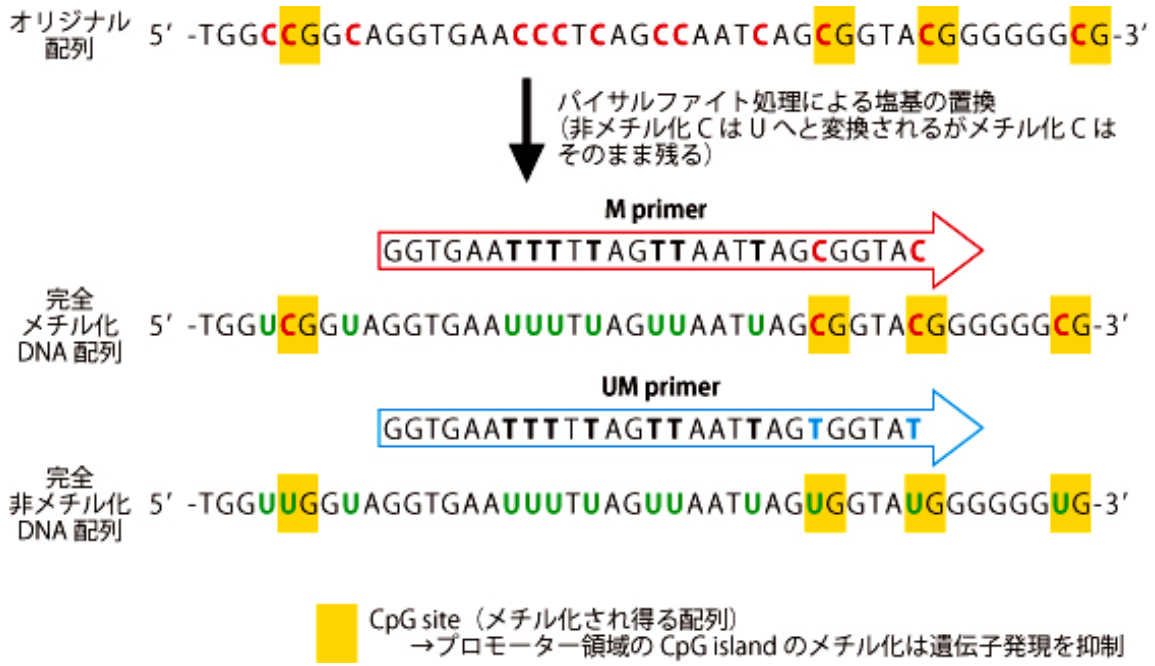


図２．バイサルファイト処理による塩基の置換

・EpiScope® MSP Kit

本製品は MSP 専用の PCR キットです。バイサルファイト処理されたウラシルを含む DNA を鋳型とし

て効率のよいPCR増幅が可能な専用酵素と最適化された組成のバッファーにより、高い増幅効率で、従来のPCR試薬と比較してメチル／非メチルの識別能が大幅に向上したMSP解析を行うことができます。リアルタイムモニタリングに適した濃度のTB Green™を含んだ状態で反応系が至適化されており、半定量的な解析が可能なリアルタイムPCRと電気泳動で増幅の有無を確認するエンドポイントPCRの両方に同じ反応条件で使用することができます。

【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） ゲノムDNAの抽出

NucleoSpin® Tissue によりゲノムDNAを抽出する。

（2） バイサルファイト処理

（3） EpiScope® MSP Kit による PCR 増幅

1） 以下の反応液を氷上で調製する。

試薬	使用量	最終濃度
2× MSP Buffer	12.5 μl	1X
TB Green Solution（×100）	0.25 μl	1X *1
PCR Forward Primer (10 μM)	0.75 μl	0.3 μM
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.75 μl	0.3 μM
MSP Enzyme	0.6 μl	
DNA	2 μl	*2
滅菌精製水	8.15 μl	*2
Total	25 μl	

*1 エンドポイントPCR（電気泳動による解析）の場合にも必ずTB Green Solution（×100）を添加すること。TB Greenを添加した状態で最も高い識別能が得られる。

*2 DNA濃度によって適宜調整可能。通常、バイサルファイト処理済みDNA 10～50 ng程度を使用する。

2） 以下の条件でPCR増幅を行う。

リアルタイムPCR検出、エンドポイント検出とも同じPCR条件で反応を行う。

95℃ 30秒

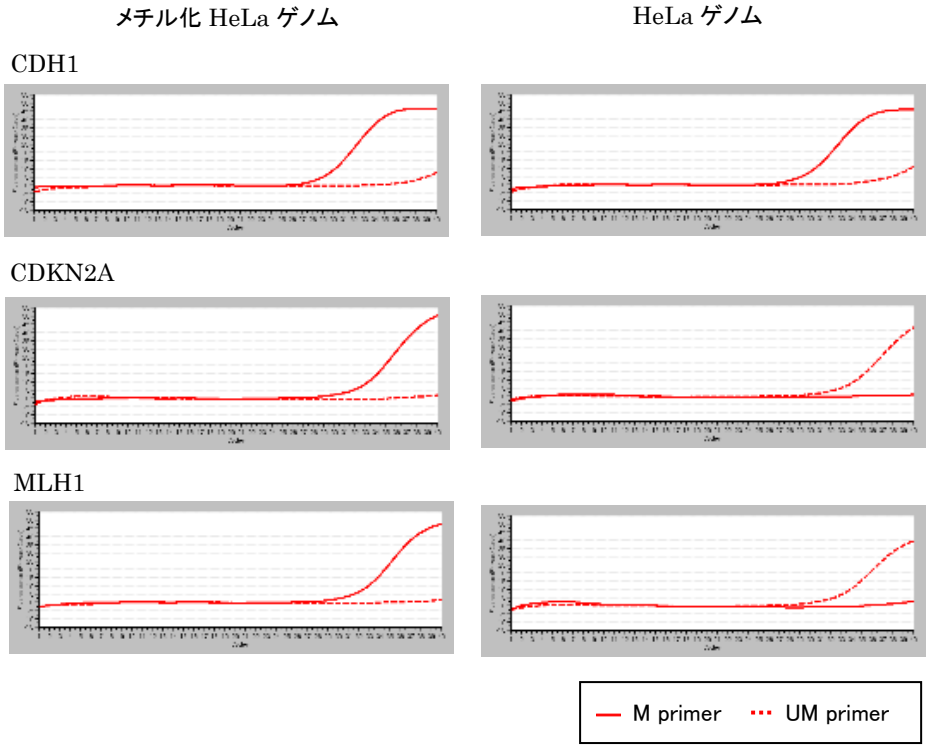
98℃ 5秒
55℃ 30秒
72℃ 1分（~200 bp）
40～45サイクル

融解曲線分析（リアルタイムPCRの場合）

3） リアルタイムPCR装置による検出または電気泳動による増幅産物の確認を行う。

【3】実験例

HeLa ゲノムおよびメチル化 HeLa ゲノム（EpiScope® Methylated HeLa gDNA）各 1 g を MethylEasy™ *Xceed*（終売）を用いてバイサルファイト処理した。これらを鋳型として、CDH1、CDKN2A、MLH1 各遺伝子のプロモーター領域で本キットを用いた MSP を行った。リアルタイム PCR には Thermal Cycler Dice® Real Time System を用い、エンドポイント検出では TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice®で反応後の反応液をアガロースゲル電気泳動に供して結果を確認した。



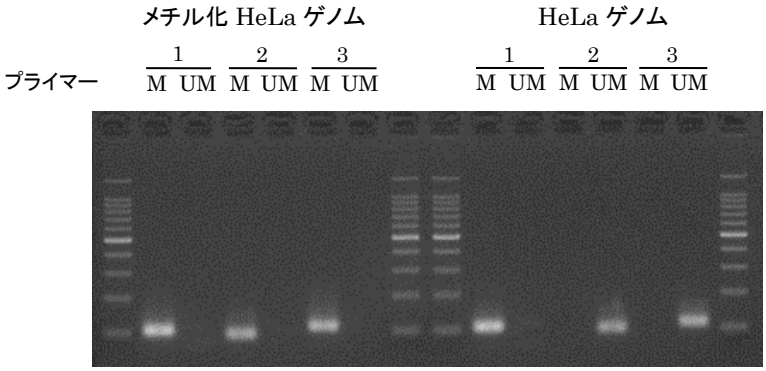


図３． Methylation Specific PCR 結果
メチル化 HeLa ゲノムを鋳型とした場合、3 種のターゲットすべてで M primer（メチル化 DNA 検出用のプライマー）での増幅が見られ、UM primer（非メチル化 DNA 検出用のプライマー）では増幅が確認されなかった。それに対し、Native な HeLa ゲノムを鋳型とした場合には CDKN2A、MLH1 で UM primer での増幅が見られ、この領域はメチル化されていないことが確認できた。クロス反応はほとんどなく、メチル／非メチルの識別が明確にできていることが分かる。

【4】製品リスト

NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10/50/250）

MethylEasy™ *Xceed* Rapid DNA Bisulphite Modification Kit（終売）

EpiScope® MSP Kit（製品コード R100A/B）

EpiScope® Methylated HeLa gDNA（製品コード 3520）

EpiScope® Methylated HCT116 gDNA（製品コード 3522）

EpiScope® Unmethylated HCT116 DKO gDNA（製品コード 3521）

f. COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)

◆特別な解析装置を必要としないコストパフォーマンスに優れた手法

◆特定領域の DNA メチル化解析に

【1】原理

COBRA 法では、バイサルファイト処理後にメチル化 DNA と非メチル化 DNA に共通のプライマーを用いて解析対象領域を PCR 増幅後、メチル化 DNA と非メチル化 DNA で配列が異なる箇所を認識する制限酵素で処理します。

・TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA)

バイサルファイト処理後の PCR には、TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA)がお勧めです。バイサルファイト処理した DNA にはウラシルが含まれており、α型の DNA ポリメラーゼでは効率良く増幅することができませんのでご注意ください。

【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）ゲノム DNA の抽出

NucleoSpin® Tissue によりゲノム DNA を抽出する。

（2）バイサルファイト処理

（3） TaKaRa EpiTaq™ HS による PCR 増幅

1）以下の反応液を氷上で調製する。

試薬	使用量	最終濃度
TaKaRa EpiTaq HS (5 units/μl)	0.25 μl	1.25 units
10× EpiTaq PCR Buffer (Mg^{2+} free)	5 μl	1×
25 mM $MgCl_2$	5 μl	2.5 m
dNTP Mixture (2.5 mM each)	6 μl	0.3 mM each
Forward Primer (20 μM)	1 μl	0.4 μM
Reverse Primer (20 μM)	1 μl	0.4 μM
DNA	<100 ng	
滅菌精製水	Up to 50 μl	

2）以下の条件で PCR 増幅を行う。

98℃　10 秒
55℃　30 秒
72℃　30 秒～1 分 *1
（30～40 サイクル）*2

*1　伸長反応時間は、1 kb/1 分を目安に設定する。増幅効率が悪い場合は、時間を延長すると改善することがある。
*2　増幅量が少ない場合は、サイクル数を増やす。

3）PCR 後、5μl をアガロース電気泳動し増幅状態の確認を行う。

（4）PCR 産物の精製

PCR 産物精製キットなどを用いて精製し、50μl 程度の容量にする。

（5）制限酵素処理

1）以下の反応液を氷上で調製する。

試薬	使用量	最終濃度
10×Buffer	5μl	1×
制限酵素	適宜	10～20 U
精製済 PCR 産物	20～40μl	
滅菌精製水	適宜	
Total	50μl	

2）至適温度で 4 時間以上、制限酵素処理を行う。

（6）　エタノール沈殿による濃縮

1）制限酵素処理後の反応液に以下の試薬を加える。

4μl　　Gen とるくん™エタ沈キャリア
5μl　　3 M 酢酸ナトリウム, pH 5.2
125μl　　エタノール（>99%）

2）12,000 rpm、4℃、15 分間遠心し、上清を除去する。
3）250μl の 70%エタノールを添加しリンスする。
4）12,000 rpm、4℃、5 分間遠心し、上清を完全に除去する。
5）沈殿を乾燥させ、10μl の滅菌精製水に溶解する。

（7）電気泳動による確認

3% PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve アガロースゲルで電気泳動を行う。

【3】実験例

HeLa S3 ゲノム DNA およびメチル化 HeLa ゲノム DNA（EpiScope® Methylated HeLa gDNA）各 2.6μg を MethylEasy™ *Xceed*（終売）でバイサルファイト処理し、処理後のゲノム DNA 80 ng を鋳型として MLH1 の CpG アイランド領域の一部を TaKaRa EpiTaq HS (for bisulfite-treated DNA) 用い

て増幅した。PCR 産物（増幅サイズ：384 bp）をスピンカラム精製して 50 μl で溶出した。そのうち 20 μl を制限酵素処理（*Taq* I；T↓CGA、65℃ 4 時間）し、エタノール沈殿で 10 μl に濃縮した後、電気泳動に供した。

GTAAGGGGAGAGGAGGAGTTTGAGAAGYGTTAAGTATTTTTTTYGTTTTGYGTTAGATTATTTTAGTAGAGGTAT
ATAAGTTYGGTTTYGGTATTTTTGTTTTTATTGGTTGGATATTTYGTATTTTTYGAGTTTTTAAAAAYGAATTAATA
GGAAGAGYGGATAGYGATTTTTAAYGYGTAAGYGTATATTTTTTTAGGTAGYGGGTAGTAGTYGTTTTAGGGAGG
GAYGAAGAGATTTAGTAATTTATAGAGTTGAGAAATTTGATTGGTATTTAAGTTGTTTAATTAATAGTTGTYGTTG
AAGGGTGGGGTTGGATGGYGTAAGTTATAGTTGAAGGAAGAAYGTGAGTAYGAGGTATTGAGGTGATTGGTTGA
AGGTATT

図４． MLH1 の COBRA 検出系の設計
MLH1 の CpG アイランドの PCR 増幅領域（384 bp）をバイサルファイト処理変換した配列を示す。配列中の Y は、バイサルファイト処理によりメチル化状態に応じて C または T に変化する塩基である。黄色で示したのが *Taq* I の認識配列であり、C がメチル化されている場合には TCGA となり切断されるが（128 bp と 254 bp）、非メチルなら TTGA に変換されるため切断されない。なお、ピンク色は PCR プライマー位置である。

M 1 2 M

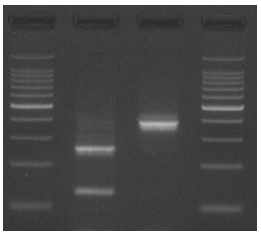


図５． COBRA の結果
レーン１ ：メチル化 HeLa ゲノム DNA
レーン２ ：HeLa S3 ゲノム DNA
レーン M：100 bp DNA Ladder 200 ng
メチル化 HeLa ゲノム DNA 由来の PCR 増幅産物は予想通りのサイズに切断されたが、HeLa S3 ゲノム DNA 由来の PCR 増幅産物は切断されておらず、HeLa S3 細胞の MLH1 遺伝子の解析対象領域は非メチル化状態であると考えられる。

【4】製品リスト

NucleoSpin® Tissue（製品コード 740952.10/50/250）
MethylEasy™ *Xceed* Rapid DNA Bisulphite Modification Kit（終売）
TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA)（製品コード R110A/B）
EpiScope® Methylated HeLa gDNA（製品コード 3520）
EpiScope® Methylated HCT116 gDNA（製品コード 3522）
EpiScope® Unmethylated HCT116 DKO gDNA（製品コード 3521）
制限酵素各種
Gen とるくん™エタ沈キャリア（製品コード 9094）
PrimeGel™ Agarose PCR-Sieve（製品コード 5810A）