

Applied Biosystems 3130/3130xl ジェネティックアナライザにおけるマイクロサテライト解析

はじめに

マイクロサテライトは、ショートタンデムリピート (STR) と呼ばれ、2～7 スクレオチドの繰り返し配列を含む多型 DNA 座です。ある遺伝子座の繰り返し回数は個々に異なるため、様々な長さを持つアリルが生じます。アリル変異、繰り返し回数、アリル頻度のデータは、様々な生物において数千におよぶマーカーが利用可能です。このように選択肢の多い非常に情報量の豊富なマーカーから選択が可能のため、マイクロサテライト解析は、連鎖マッピング試験、関連解析、生物の同定において広く利用されているツールです。

この分野にキャピラリーベースの遺伝子解析システムを選択する際は、いくつかの要因を考慮する必要があります。反応条件の最適化、適切な泳動条件、効率的なアッセイデザインは、確実に高品質のデータを取得し、費用のかかる再測定を最小限にするために必要不可欠です。さらに、大量のマイクロサテライトデータを管理するには、データの作成および解析からアリルのスコアリングにいたるまで、各ステップについて高度に自動化された効率的なワークフローが必要です。

本ファクトシートでは、マイクロサテライト解析を成功させるために考慮すべき要因および、Applied Biosystems 3130 シリーズジェネティックアナライザが最適化されたケミストリと、新しい GeneMapper® ソフトウェア v3.7 を併用することによって完全なソリューションを提供する多くの理由について解説します。

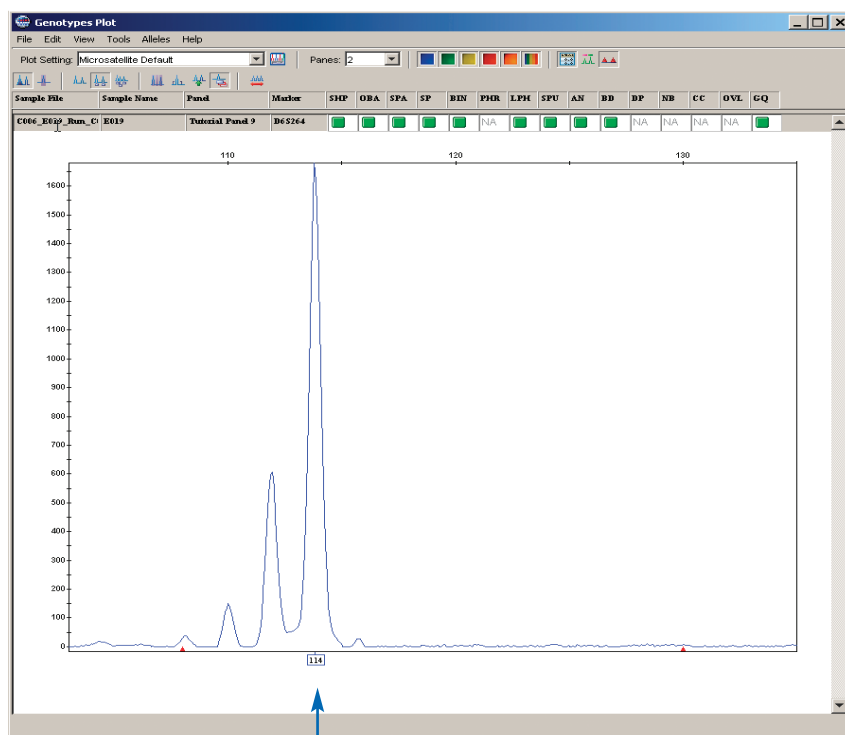


図1 ジ、トリ、テトラヌクレオチドのマイクロサテライト座の PCR 増幅では、アリルピークより短い副産物が発生します。これらのスタッターピークは、ジヌクレオチドの繰り返し遺伝子座より頻繁に発生し、繰り返し回数が長くなるにつれ、スタッターは減少します。ここに示したのは、ジヌクレオチドマイクロサテライト座のピークです。GeneMapper® ソフトウェアアリルスタッターピークを除去しアリルピークを正確にひろっています。

マイクロサテライト反応の最適化

マイクロサテライト解析中に最も頻繁に発生する問題は、非特異的または特異性の低いPCR増幅です。マイクロサテライト解析プロジェクトでは、サンプルあたり数百の遺伝子座を取得する必要性が生じることがよくあります。多数の反応を管理するには効率的なプライマーデザインと、強力で普遍的な反応条件が必要とされ、それによりコストのかさむ PCR 反応の再測定の頻度を大幅に低減できます。カスタムプライマーを用いたマイクロサテライト解析を実施する際には、最高の結果を確実に得るための最適化が必要になります。アプライドバイオシステムズ社は、最高の

性能を提供するマイクロサテライトベースのキットを製造、販売をしています。

マイクロサテライト反応のアーティファクト

PCR ベースの多くのシステムでは、データの解釈を困難にするアーティファクトが発生します。マイクロサテライト解析で観察される PCR 増幅のアーティファクトとしては、スタッターと鋳型非依存性 3' A ヌクレオチド付加 (「プラス A」付加と呼ばれることもある) の 2 つがよく知られています。アプライドバイオシステムズ社では、特別なケミストリと高度なソフトウェアを組み合わせ、これらのアーティファクトを実際のアリルピークと区別します。

スタッターアーティファクト

スタッターアーティファクトは、実際のアリルピークの前に複数のピークとして観察されます。ピークの数とその強度は、PCR 産物中の繰り返しの長さとし繰り返し回数に比例します。スタッターの特徴はよく分かっており再現性がありますが、データ解析を複雑化する恐れもあります。Applied Biosystems GeneMapper® ソフトウェアは、実際のアリルを正確にスコアリングできるようスタッターアーティファクトを同定し、フィルタするように設計されています。

プラス A 付加

不完全な A ヌクレオチド付加によって生じるプラス A 付加も、ピークパターンを複雑性を増し、実際のアリルピークの認識をより困難にします(図 2)。反応条件は、これらの遺伝子座依存性アーティファクトに大きく影響しますが、プラス A 付加ピークの発生を最小限にするために、アプライドバイオシステムズ社のほとんどのマイクロサテライトキットでは、プラス A 付加が促進され、より一貫性のあるアリルピークパターンが得られるようになっています。プラス A 付加を促進する最適反応および GeneMapper® ソフトウェアによるスタッターとプラス A 付加のフィルタ能を組み合わせることにより、実際のアリルを正確に同定できます。

マルチプレックス機能

マイクロサテライト解析プロジェクトにかかるコストと時間は、各キャピラリー内で複数のマーカーを同時に電気泳動することで最小限にすることができます。マルチプレックス機能は、測定条件の最適化、フラグメントサイズの違い、キャピラリー電気泳動 (CE) システムで使用できる色素ラベルの種類に応じて決まります。多色蛍光ラベルを使うと、同一キャピラリーにて複数の遺伝子座を解析できます。フラグメントの区別には、カラーとサイズを利用します。複数の蛍光色素を使用し、その色素を適切に

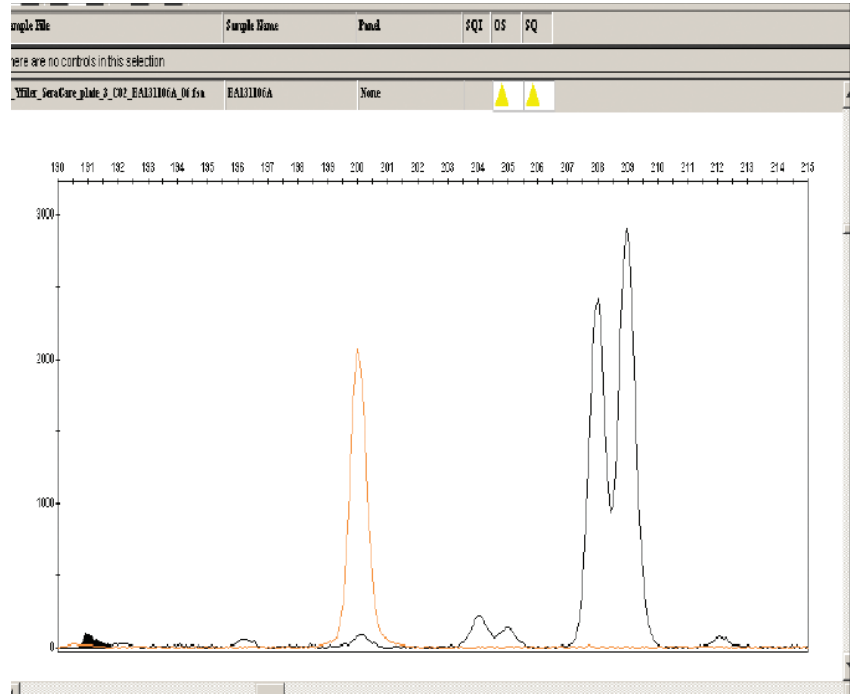


図 2 不完全な 3' A ヌクレオチド付加によりスタッターピークが発生することがあります。

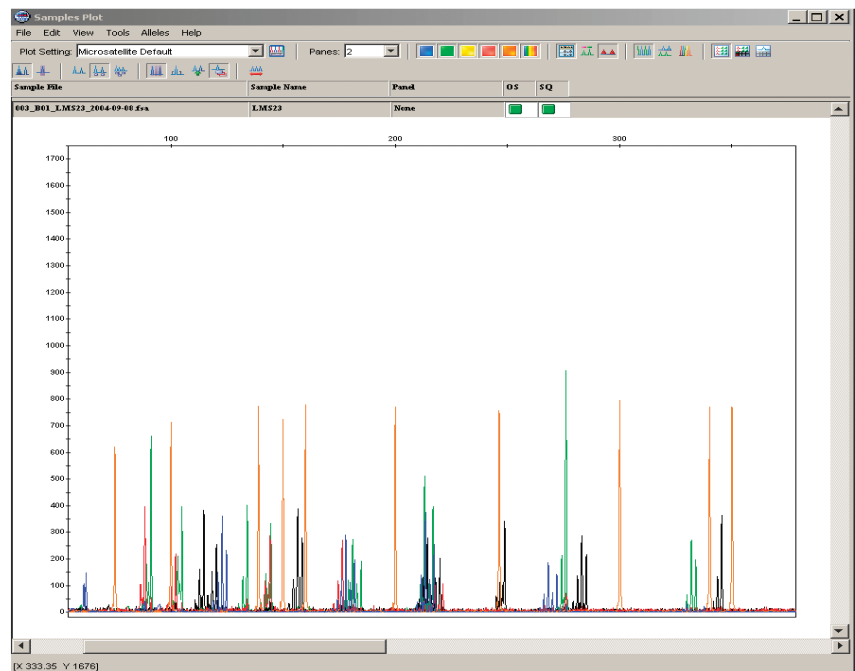


図 3 5 色蛍光ケミストリを使うと、1 本のキャピラリーで測定できるマーカーの数が増加し、スループットが改善します。上の図は、1 本のキャピラリーで 18 マイクロサテライト座を同時に電気泳動をした例です。

選択することは、複数の蛍光スペクトルのオーバーラップによって生じる解析の複雑化を防止するために必要不可欠です。ほとんどの CE システムは 4 色蛍光ケミストリですが、アプライドバイオシステムズ社の 5 色

蛍光ケミストリシステムでは、マルチプレックス機能が向上し(図 3)、スペクトル解像度が改善し、スループットが 33% も増加することで全体のコストを削減できます。

データコレクション

データ作成は、マイクロサテライトプロジェクトのワークフローの中で重要なコンポーネントの 1 つです。信頼性の高い高品質の結果を自動的に作成できるシステムの機能は、プロジェクトの完了までに必要な時間とコストに影響を与えます。Applied Biosystems 3130 シリーズは、最大限の柔軟性で簡単に電気泳動のスケジュール作成と分析の優先付けが行えます。

Data Collection ソフトウェアにより、最小限の操作ですばやくセットアップでき、より短時間でデータを解析できます。

優れた精度と解像度を確保

マイクロサテライト解析における精度と高解像度は、次の要因に依存します。

- フラグメントサイズ
- 蛍光色素
- サイジングアルゴリズムの強化
- 電気泳動分離条件の最適化

分離条件を最適化する際は、次の 4 つの要因を考慮する必要があります。

1. 温度制御
2. ポリマーの種類
3. キャピラリーレイの長さ
4. 消耗品の品質と使いやすさ

DNA フラグメントのサイジング

DNA フラグメントサイジングに関して、「DNA フラグメントのサイズ計算値はフラグメントの長さ (bp) に相当する」という誤った概念が一般に普及しています。しかし、実際には DNA の電気泳動での移動度はシーケンスに依存するため、同じ長さの DNA フラグメントでも異なる移動度を持ち、その結果、サイズ計算値が異なる場合もあります。サイズは、塩基対の長さではなく、フラグメントの移動度から計算されるため、マイクロサテライト解析において再現性と精度が決定的な要因になります。3130 および 3130xl システムは、すべての

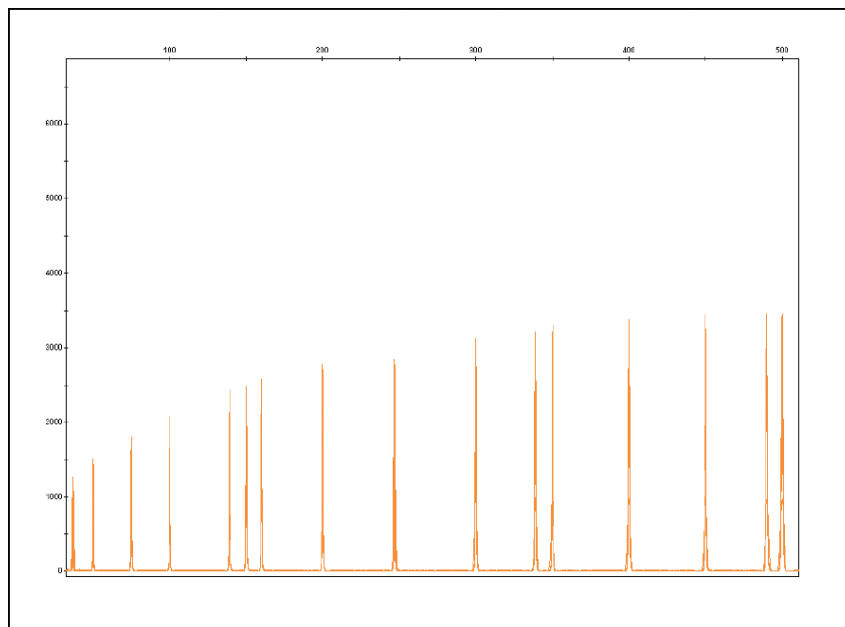


図 4 16 回分の GeneScan™-500 LIZ® サイズスタンダード電気泳動図のオーバーレイで、3130 シリーズシステムのサイジング精度を示します。

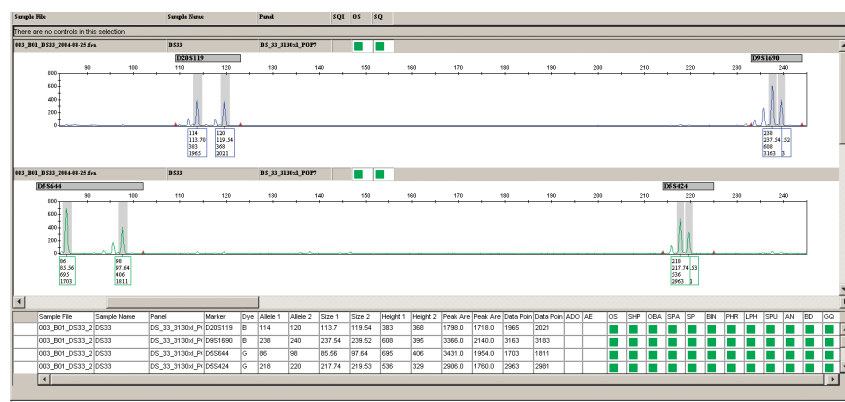


図 5 高度なデータ管理および解析ソフトウェアは、迅速なアリスコアリングとデータ確認のための視覚的なデータテーブルを作成します。

マイクロサテライトアプリケーションに対して最も再現性の高いデータを提供します (図 4)。また、これらのシステムには、より効率的なポリマーの取り扱い、セットアップ時間の大幅な削減をもたらす次のような新しい拡張機能が含まれています。

- 3130 POP-7™ ポリマーの使用
- より優れた温度制御で移動均一性を改善するデテクションセルヒーター
- 自動ポリマー充填システム

データの解析と管理

マイクロサテライト解析プロジェクトでは、少ないサンプルで多くの遺伝

子座をスクリーニングするか、多くのサンプルで少ない遺伝子座をスクリーニングするかに応じて、数百または数千のサンプルが関与します。この様に多数のサンプル解析には効率のよいデータ管理ワークフローが非常に重要であり、Applied Biosystems フラグメント解析ソフトウェアは、次のように高度なデータ解析および管理機能を提供します。

- 柔軟性
- 正確なフラグメントサイジングとアリスコアリング
- 自動化

GeneMapper® ソフトウェアは、これらすべての特徴を備え、サイズの大小にかかわらず、広範なプロジェクトを簡単に管理できます。

GeneMapper® ソフトウェアの高度なアルゴリズムは、様々の長さを持つマイクロサテライトの繰り返し構造を区別し、プラス A とスタッターのピークを含む増幅ケミストリのアーティファクトを認識し、フィルタします。さらに、本ソフトウェアは、ジェノタイピングのクオリティ (GQ) スコアを利用して、低品質のサンプルデータには研究者の視認を容易にするためのフラッグが立てられ、解釈の容易な形式を持つソート可能な表を作成します。本ソフトウェアのこのような利点により、研究者は大量のマイクロサテライトデータを正確かつ迅速に確認できます。

結論

5 色蛍光ケミストリとあらかじめ最適化された分析条件とを合わせることで、3130 シリーズシステムの感度、向上したデータ品質および精度は、マイクロサテライト解析に理想的なものになっています。さらに、柔軟かつ直感的なデータ管理オプションを備えた解析ソフトウェアは、小規模または大規模な解析も可能にします。これらの装置に GeneMapper® ソフトウェアを組み込むことにより、ボタン操作 1 つでデータ収集、フラグメントサイズのコーリング、アリスコアリングをグラフ形式および表形式の両方で行えます。これらの機能により、最小限のハンズオンタイムとデータ確認作業で大量の高品質データを得ることができ、マイクロサテライトプロジェクトに必要な時間とコストを大幅に削減できます。



iScience. バイオロジカルシステムの複雑な相互作用をより広く、深く理解するために、ライフサイエンティストたちは従来の研究手法に先端技術、そしてインフォマティクスを結び付ける新たな発見への革命的なアプローチを開発しています。共に歩むパートナーとしてアプライドバイオシステムズは、この新しい **Integrated Science**、"iScience" を可能にする革新的な製品、サービス、知的情報を提供します。

お問合せ先

本社：

〒104-0032

東京都中央区八丁堀4-5-4

TEL 03 (5566) 6100 FAX 03 (5566) 6501

大阪：

〒564-0052

大阪府吹田市広芝町10-28

TEL 06 (6389) 1201 FAX 06 (6389) 1206

Applera Corporation は、ライフサイエンスに関する世界有数の技術を情報を提供しています。Applera Corporation は、Applied Biosystems と Celera Genomics から構成されています。

NOTICE TO PURCHASER:
PLEASE REFER TO THE APPLIED BIOSYSTEMS 3130 AND 3130xi GENETIC ANALYZER GENEMAPPER SOFTWARE AND POP-7 POLYMER USER'S MANUAL FOR LIMITED LABEL LICENSE OR DISCLAIMER INFORMATION.

Applied Biosystems, GeneMapper, and LIZ are registered trademarks and AB (Design), Applera, GeneScan, Hi-Di, iScience, iScience (Design), POP, and POP-7 are trademarks of Applera Corporation or its subsidiaries in the US and/or certain other countries.

© 2004. Applied Biosystems. All Rights Reserved.
Information subject to change without notice.

Printed in Japan
Publication GEA008-103