

キャピラリーゲル電気泳動による 1 本鎖及び 2 本鎖 DNA の高分解能分離

馬場 嘉信[®], 富崎 理代, 角田ちぬよ,
田中 淳子, 秀 佳余子, 津波古充朝*

(1993 年 6 月 18 日受理)

DNA の高分解能分離を達成するために、キャピラリーゲル電気泳動におけるゲル組成が、DNA の分解能に与える影響について検討した。1 本鎖 DNA の分離においては、非架橋ポリアクリルアミドのゲル濃度について検討し、最適条件下では、オリゴマーから 250 塩基までの 1 本鎖 DNA が 60 分以内に 1 塩基の違いのみでベースライン分離された。又、2 本鎖 DNA の分離においては、架橋ポリアクリルアミドゲルのゲル濃度及び架橋度を検討し、最適条件下では、PCR 生成物を含む 100 から 12000 塩基対の 2 本鎖 DNA が、40 分以内に 10 塩基程度の違いで分離された。その際の理論段数は、1 m 当たり数百万段であった。

1 緒 言

キャピラリー中にポリアクリルアミドなどのゲルを充てんしたキャピラリーを用いるキャピラリーゲル電気泳動は、核酸の分離において非常に高い分解能を有することが明らかになってきた^{1)~4)}。キャピラリーゲル電気泳動は、1 本鎖 DNA^{5)~8)}及び 2 本鎖 DNA^{9)~12)}の分離に応用されており、その際の理論段数は 1500~3000 万段にも達している⁶⁾⁷⁾。

キャピラリーゲル電気泳動において、DNA の分離に影響を与える主要な因子としては、ゲル組成、電圧、キャピラリーのサイズ、キャピラリーの温度、緩衝液組成、DNA の塩基組成などが知られている。本研究では、キャピラリーゲル電気泳動による 1 本鎖及び 2 本鎖 DNA の分離条件を最適化するために、これら条件の中で最も重要な因子であるゲル組成が、分離に及ぼす影響について検討した。

2 実 験

2・1 試 薬

ポリデオキシアデニル酸 {poly(dA)} はシグマ製、ヌクレアーゼ P1 はヤマサ醤油製、1 kbp DNA ladder は Gibco 製、PCR 用のテンプレートであるラムダ DNA 及び Gene AMP PCR 試薬キットは宝酒造製を用いた。

* 神戸女子薬科大学: 658 兵庫県神戸市東灘区本山北町 4-19-1

1 kbp DNA ladder は、23 種 (75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506, 517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7124, 8144, 9162, 10188, 11144, 12314 塩基対) の 2 本鎖 DNA 断片の混合物である。poly(dA) は、ヌクレアーゼ P1 を用いて、既に報告した方法⁷⁾により加水分解したものを用いた。PCR 用のプライマーは DNA 合成装置 (ミリポア Cyclone Plus) により合成した。他の試薬は、すべて和光純薬製の特級品あるいは電気泳動用試薬を使用した。

2・2 ゲル充てんキャピラリーの調製

ゲル充てんキャピラリーの調製は、2 種類の方法 (1) キャピラリー内壁を前処理し、キャピラリー内壁のシリカと充てんしたポリアクリルアミドゲルを化学結合させる方法 (2 本鎖 DNA 分離の場合)^{5)~9)}、(2) キャピラリー内壁を未処理のままポリアクリルアミドゲルを充てんする方法 (1 本鎖 DNA 分離の場合)⁷⁾⁸⁾で行った。これらの方法は、キャピラリー内壁の前処理を行うか否かの違いのみで、ほとんどは共通の操作を行う。方法 (1) では、以下の手順で、ゲル充てんキャピラリーを調製した。方法 (2) では、a の操作の二官能基を有する試薬による処理の部分を省略すればよい。

a. 適当な長さのキャピラリー (50 cm 程度) に 1 M 水酸化ナトリウム水溶液を 15 分間通し、その後、蒸留水を 10 分間通す。更に、二官能基を有する試薬 (3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン, 0.4%)

の酢酸溶液（6 mM）をキャピラリーに10分間通し、1時間放置する。その後、蒸留水を10分間通し、キャピラリー内を洗浄する。

b. アクリルアミドの保存溶液（40% T, 0~5% C）及び緩衝液を調製する。アクリルアミド溶液を緩衝液で希釈し、サンプルのサイズに合わせて適当なゲル濃度（5%程度）に調節する。

c. この溶液5mLを超音波でよく脱気した後、10%過硫酸アンモニウム溶液と10%テトラメチルエチレンジアミン（TEMED）溶液をそれぞれ20μLを加えて、キャピラリー中に5分間通す。

d. ゲル化が終了するまで数時間あるいは一夜放置する。

2・3 装置と操作

ラムダDNAをテンプレートとして、500塩基対のDNA断片をPCR法により25サイクル（Techne PHC-3 Thermal Cyclerを用いて、1サイクルが94°Cで1分、37°Cで1分、72°Cで1分）の反応で増幅した。

DNAの分離は、キャピラリー電気泳動装置（アプライドバイオシステムズ Model 270A, ウォーターズ Quanta 4000, ベックマン P/ACE-2050）により行った。溶融シリカキャピラリー（内径100μm, 外径375μm）はGLサイエンス製を用いた。上記の方法で調製したゲル充てんキャピラリーを装置に取り付け、サンプルを電気泳動的に注入し（5, 10kV, 1~5秒間）、10kVの電圧をかけて泳動した。泳動時の緩衝液は、1本鎖DNAの場合が0.1Mトリス-ホウ酸-7M尿素（pH 8.6）、2本鎖DNAの場合が0.1Mトリス-ホウ酸-2

mM EDTA（pH 8.3）を用いた。DNAの検出は紫外吸収測定（254 nmあるいは260 nm）により行った。

3 結果と考察

キャピラリーゲル電気泳動に用いる、ポリアクリルアミドは細孔を有するゲルであり、その細孔の大きさは、ゲル組成 [ゲル濃度（%T）と架橋度（%C）]により決まる。又、非架橋ポリアクリルアミド（0%C）においても同様の細孔が生成する。

$$\%T = \frac{\text{アクリルアミド(g)} + \text{ビス(g)}}{\text{アクリルアミド溶液(ml)}} \times 100 \quad (1)$$

$$\%C = \frac{\text{ビス(g)}}{\text{アクリルアミド(g)} + \text{ビス(g)}} \times 100 \quad (2)$$

DNAは、ゲル中の細孔を通り抜けながら泳動するので、DNAのサイズが大きいほど、ゲルのマトリックスから受ける抵抗が大きくなり、電気泳動の移動度は小さくなる。このように分子ふるい的に分離が行われるキャピラリーゲル電気泳動においては、細孔の大きさと直接関連のあるゲル組成は、分離を左右する最も重要な因子である。

架橋したポリアクリルアミドゲルによる1本鎖DNAの分離については、既に報告したように^{1,2)}、架橋度が1.5~5%Cの範囲については、ゲル濃度が10%T以下であれば、ポリヌクレオチドの分離が可能であることが明らかとなった。従って、本研究では、非架橋ポリアクリルアミドの場合のゲル濃度の1本鎖DNAの分離への効果について検討した。

Fig. 1 に非架橋ポリアクリルアミド（9%T, 0%C）

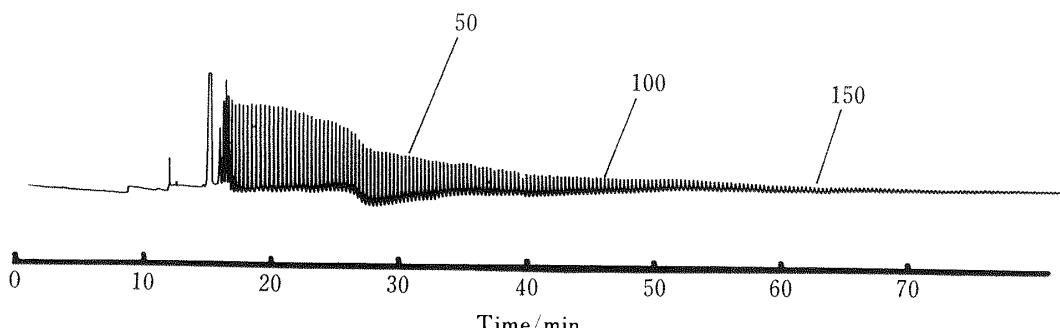


Fig. 1 Capillary electrophoretic separation of poly(dA) digested by nuclease P1 using a linear polyacrylamide (9%T, 0%C) filled capillary

Conditions: capillary 100-μm i.d., 375-μm o.d., 50-cm length, 30-cm effective length; Running buffer 0.1 M Tris-borate and 7 M urea; pH 8.6; Field, 200 V/cm; current, 13 μA; Injection: 5 kV for 2 s; Detection: 260 nm

を用いた、ポリデオキシアデニル酸 {poly(dA)} の分離例を示す。150 塩基までの 1 本鎖 DNA 断片の混合物が、それぞれ 1 塩基のみの違いにより完全に分離されている。このときの分析時間は、約 60 分であった。同じゲル濃度の架橋ポリアクリルアミドゲル (9% T, 5% C) により実験を行った結果では、同様の分離に要する時間は約 90 分であった。このことは、同じゲル濃度においても、架橋ポリアクリルアミドゲルの細孔が、非架橋ポリアクリルアミドのそれより小さいことを示している。

9% T のポリアクリルアミドは、その細孔が比較的小ないので、150 塩基以上のポリヌクレオチドについては分離が困難であった。従って、ゲル濃度を 7% T に下げて、1 本鎖 DNA の分離を試みた (Fig. 2)。その結果、60 分以内に 250 塩基までの 1 本鎖 DNA 断片の混合物が、それぞれ 1 塩基のみの違いによりほぼベースライン分離された。9% T の場合と比較して、単位時間当たりに分離できるピーク数が増加しており、又、比較的サイズの大きいポリヌクレオチドの分離が可能になっていることが分かる。この際の、理論段数は、1 m 当たり 300~500 万段であった。更に、ゲル濃度を下げて、5% T でも実験を行ったところ、高速化することはできたが、それぞれのポリヌクレオチドの分離度が下がり、ベースライン分離することができなくなった。従って、非架橋ポリアクリルアミドを用いた 1 本鎖 DNA の分離では、7% T のゲル濃度の場合が、最も速く多くのポリヌクレオチド断片をベースライン分離するための最適条件であることが分かった。これは、架橋したポリアク

リルアミドゲルの場合の最適条件である、ゲル濃度 (3~5% T)⁷⁾ より若干濃度が高くなっている。これは、非架橋ポリアクリルアミドの細孔の大きさが、同一濃度の架橋ポリアクリルアミドのそれより大きいことに起因している。

次に、架橋ポリアクリルアミドゲルを用いた、2 本鎖 DNA の分離について検討した。まず、Fig. 3 に示すように、5% T, 5% C のポリアクリルアミドゲルを用いて、1 kbp DNA ladder のサンプルの分離を試みたが、それぞれのピークはあまりよく分離されなかった。このサンプルは、75 塩基対から 12314 塩基対までの 23 種類の 2 本鎖 DNA 断片を含んでおり、45 分までに泳動している比較的小さい DNA 断片 (500 塩基対以下) の分離は、ある程度達成されている。しかし、55 分以降の大きい断片 (1000~12000 塩基対) については、ほとんど分離されていない。これは、ここで用いたゲル濃度及び架橋度がいずれも大きいために、大きい DNA 断片が泳動するには、細孔が小さすぎるためだと考えられる。

次に、架橋度を 0.5% C に下げ、いくつかのゲル濃度により、1 kbp DNA ladder の分離を行った。その結果、Fig. 4 に示すように、3% T, 0.5% C のポリアクリルアミドゲルを用いた場合に、高分解能分離が達成された。これは、既に報告された条件⁹⁾と類似した結果であった。この条件下では、1 kbp DNA ladder サンプルに含まれる 23 種類の 2 本鎖 DNA 断片がすべてほぼ完全にベースライン分離されている。しかも、分析時間はわずか 35 分しか要しない。Fig. 4 の例では、1 kbp DNA

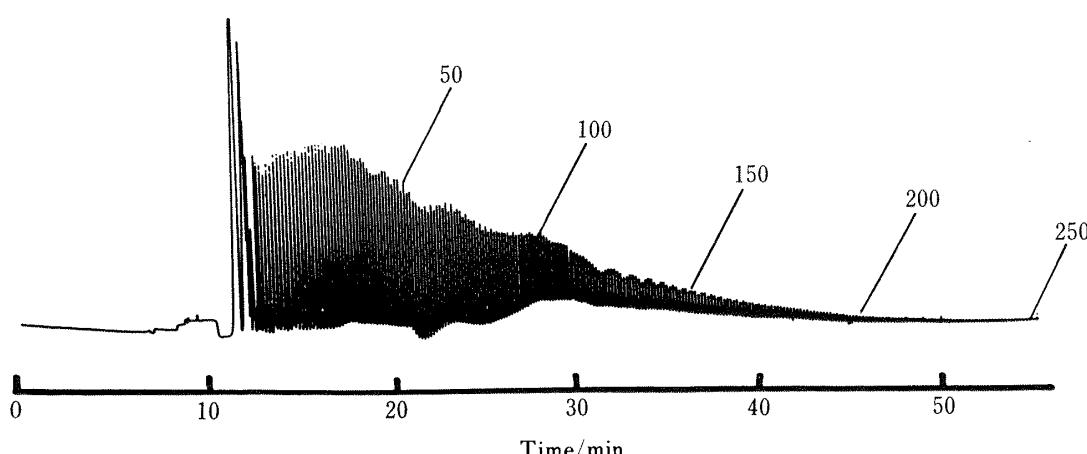


Fig. 2 Capillary electrophoretic separation of poly(dA) digested by nuclease P1 using a linear polyacrylamide (7% T, 0% C) filled capillary
Separation conditions as in Fig. 1

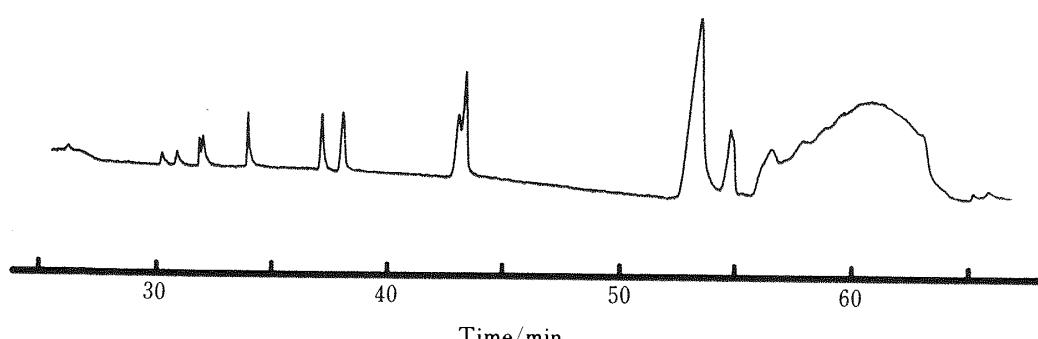


Fig. 3 Capillary electrophoretic separation of 1 kbp DNA ladder using a crosslinked polyacrylamide gel (5% T, 5% C) filled capillary

Conditions: running buffer, 0.1 M Tris-borate and 2 mM EDTA, pH 8.3; field, 200 V/cm; current, 18 μA. Other conditions as in Fig. 1

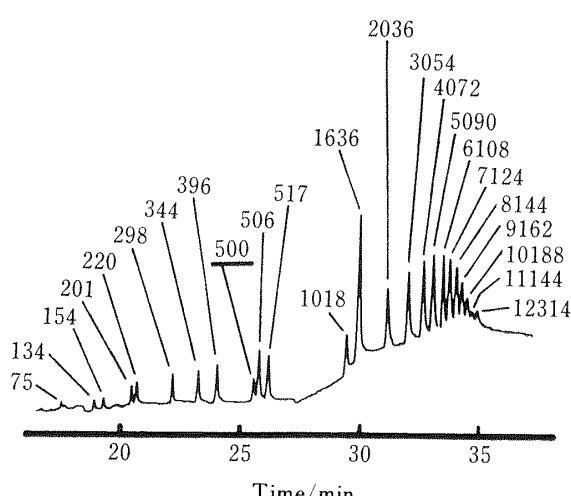


Fig. 4 Capillary electrophoretic separation of a mixture of the 500 bp PCR product and 1 kbp DNA ladder using crosslinked polyacrylamide gel (3% T, 0.5% C) filled capillary.

Conditions: capillary, 100-μm i.d., 375-μm o.d., 50-cm length, 42-cm effective length; injection, 10 kV for 5 s; detection, 254 nm. Other conditions as in Fig. 3

ladder サンプルに 500 塩基対の PCR 反応生成物を加えたサンプルを用いている。図から明らかなように、この PCR 反応生成物と 1 kbp DNA ladder に含まれる、506 及び 517 塩基対の DNA 断片はほぼ完全に分離されている。これらの断片は、従来のゲル電気泳動で分離することができないものである。このことは、キャピラリーゲル電気泳動の分解能が非常に高いことを示している。このときの理論段数は、1 m 当たり 100~200 万段であった。

以上のように、1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA では、その分離の目的が異なるために、最適条件も異なることが明らかとなった。1 本鎖 DNA の分離は、DNA シークエンシングに応用されるので、シークエンシングを高速にかつ正確に行うために、500 塩基程度までの 1 本鎖 DNA を 1 塩基のみの違いで、できるだけ速くベースライン分離する必要がある。従って、ゲル濃度は少し高めに設定する必要がある。又、2 本鎖 DNA の分離は、遺伝子マッピング、遺伝子診断などに応用されるので、その分解能は 1 本鎖 DNA の場合より若干劣っても、分離する DNA の分子量範囲が 10000 塩基対程度までと極めて広くなるので、ゲル濃度を少し下げなければならない。更に、キャピラリーゲル電気泳動の他の条件を最適化すれば、DNA のより高速・高分解能な分離が可能になる。従って、キャピラリーゲル電気泳動は、従来のゲル電気泳動で行われている、DNA シークエンシング、遺伝子マッピング、遺伝子診断などを高速化、高精度化するために応用できるものと期待される。

本研究は、一部文部省科学研究費（創成的基礎研究「ヒト・ゲノム解析研究」及びがん特別研究）の援助を得た。記して謝意を表す。

文 献

- Y. Baba, M. Tsuhako: *Trends Anal. Chem.*, **11**, 280 (1992).
- 馬場嘉信: 蛋白質・核酸・酵素, **38**, 2243 (1993).
- 馬場嘉信: ぶんせき, **1993**, 861.
- Y. Baba: *J. Chromatogr.*, **618**, 41 (1993).
- A. S. Cohen, D. R. Najarian, A. Paulus, A. Guttmann, J. A. Smith, B. L. Karger: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 9660 (1988).
- A. Guttmann, A. S. Cohen, D. N. Heiger, B. L. Karger: *Anal. Chem.*, **62**, 137 (1990).
- Y. Baba, T. Matsuura, K. Wakamoto, Y. Morita,

- Y. Nishitsu, M. Tsuhako: *Anal. Chem.*, **64**, 1221 (1992).
- 8) Y. Baba, T. Matsuura, K. Wakamoto, M. Tsuhako: *J. Chromatogr.*, **558**, 273 (1991).
- 9) D. N. Heiger, A. S. Cohen, B. L. Karger: *J. Chromatogr.*, **516**, 33 (1990).
- 10) A. Guttman, N. Cooke: *Anal. Chem.*, **63**, 2038 (1991).
- 11) A. Guttman, B. Wanders, N. Cooke: *Anal. Chem.*, **64**, 2348 (1992).
- 12) Y. Baba, C. Sumita, K. Hide, N. Ishimaru, K. Samata, A. Tanaka, M. Tsuhako: *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 955 (1993).



High-resolution separation of single- and double-stranded DNA using capillary gel electrophoresis. Yoshinobu BABA, Riyo TOMISAKI, Chinuyo SUMITA, Atsuko TANAKA, Kayoko HIDE and Mitsutomo TSUHAKO (Kobe Women's College of Pharmacy, Motoyama, Kitamachi, Higashinada-ku, Kobe-shi, Hyogo 658)

The effect of the gel composition on the resolution of single- and double-stranded DNA was investigated in order to optimize the electrophoretic conditions in the separation of DNA using capillary gel electrophoresis. In this study we prepared gel-filled capillaries in which the gel was sometimes chemically bound to the capillary inner surface. A mixture of single-stranded DNA fragments was separated by using capillaries filled with linear polyacrylamide with differing polyacrylamide concentrations and a mixture of double-stranded DNA fragments by using capillaries filled with a crosslinked polyacrylamide gel with differing gel compositions. A total of 250 bands of single-stranded DNA fragments was completely resolved within 60 min under the optimum electrophoretic conditions. The base-line resolution of double-stranded DNA fragments up to 12000 base pairs (bp) was performed under optimum separation conditions. In addition, both the 500 bp PCR reaction product and two fragments of 506 and 517 bp, which differ from each other by only less than 10 bp and are usually not separated by slab gel electrophoresis, have been base-line resolved. A plate number of $(1\sim 5) \times 10^6$ per meter was achieved. Some guidelines are presented based on the experimental results in order to select the optimum gel composition in the separation of single- and double-stranded DNA.

(Received June 18, 1993)

Keyword phrases

separation of single- and double-stranded DNA; capillary gel electrophoresis; optimization of gel composition.