

分析化学総説

キャピラリー電気泳動による DNA の分析

佐 藤 隆*

(1993 年 12 月 24 日受理)

キャピラリー電気泳動装置が市販されるようになって、既に 5 年を迎えようとしている。この間にキャピラリー電気泳動という分離手法は、一部分析科学者のみならず、広く広範な研究者の手の届くものになりつつあると同時に、様々な研究分野に応用されはじめた。本稿では、比較的短い DNA 断片の分析に限って、その応用を含めた現状を紹介する。

1 緒 言

1980 年代のはじめに Jorgenson らにより最初のキャピラリー電気泳動 (CE) に関する分離例¹⁾²⁾が報告されて以来、医薬品を代表とする合成化合物等の低分子量物質からタンパク質等の生体巨大分子に至るまでの広範な物質の CE による分離例が報告されている^{3)~5)}。CE とは文字どおり溶融シリカ等でできた細管 (キャピラリー) 内で行う電気泳動で、高速、高感度、高分離能を特徴とする分離分析法である。実際、一本鎖 DNA であればおよそ 500 塩基までの長さのものを 1 塩基の長さの違いで、30 分以内に分離できるばかりでなく^{6)~9)}、たとえ同じ長さであっても、塩基組成や立体構造の違いで分離できる¹⁰⁾ことが、又二本鎖 DNA であれば数千塩基対までのものを、約 1% の長さの違いで分離することができる¹¹⁾¹²⁾ことが報告されている。しかも、ここ数年来高性能な CE システムも市販されるようになり、従来に比べるとはるかに容易に CE を利用できる環境が整いつつある。

本稿では、著者らが最近行ってきた一本鎖 DNA の移動度解析を中心に、比較的小さな DNA 断片 (一本/二本/多重鎖 DNA) の分離及びその応用について概説する。CE における DNA の各種分離法の詳細な原理⁵⁾やゲルキャピラリーの具体的な作り方¹³⁾、あるいは CE を利用した DNA シーケンサー^{14)~17)}に関してはそれぞれの文献を参照されたい。

2 キャピラリー電気泳動装置

キャピラリー電気泳動装置とは、文字どおり内径 10~200 μm 程度、長さ 20~100 cm 程度の溶融シリカ等の細管 (キャピラリー) を用いて電気泳動を行うための装置で、その基本構造は Fig. 1 に示すとおり、キャピラリーと電解液を入れるリザーバー、高圧電源装置 (通常最高電圧 30 kV までかけられるものを使用)、オン-カラム検出器から構成されている。更に高度に自動化された装置では、各種制御のためのパーソナルコンピュータを備え、キャピラリー電気泳動装置の制御ばかりかデータ解析まで行えるものもある。

このようにキャピラリー電気泳動装置は、従来のゾーン電気泳動装置に比べかなり大掛かり、かつ高価な装置となっているが、その基本構造はオン-カラム検出器とデータ処理及び装置制御のためのパーソナルコンピュータを除けば、そして分離部の超細密化が図られていることを除けば、驚くほど酷似しているといつてよい。

通常の CE では、キャピラリー内はポリアクリルアミドゲル等の支持体で満たすことなく、直接キャピラリー内に電解液を注入し、電気浸透流の存在下で試料成分の分離が行われる。このように CE では電気浸透流を容認するばかりでなく、更に電気浸透流を積極的に分離に利用する EKC (electro-kinetic chromatography)¹⁸⁾という分離技法も開発され、電荷を持たない試料成分も界面活性剤との親和性に基づいて分離することができるようになった。このように CE においては、中空キャピラリーを使用することが一つの大きな特徴となっており、合成化合物の分離からタンパク質の分離まで広く利用されている。しかし DNA 関連物質の分離においては、中空キャピラリーと EKC の組み合わせは核酸構成

* ベックマン (株) 営業企画部: 102 東京都千代田区三番町 6
現勤務先 日本ベクトン・ディッキンソン (株) イムノサイトメトリーシステムズ事業部: 107 東京都港区赤坂 8-5-34

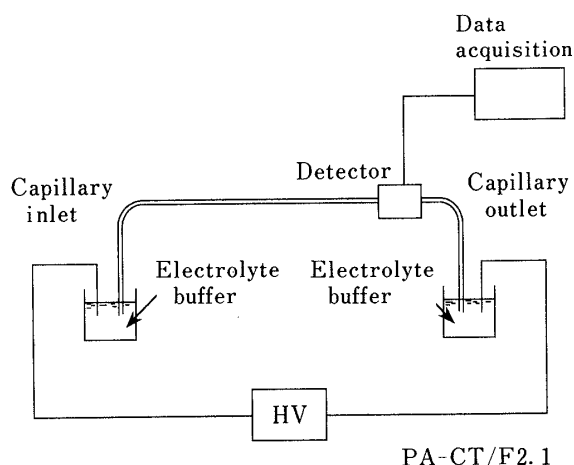


Fig. 1 Schematic diagram of capillary electrophoresis instrument

System is composed of two electrolyte reservoirs connected by a capillary (20~100 μm i.d., 20~100 cm long), a 30 kV power supply and an on-column detector. In most cases, a personal computer is used for both system control and data acquisition/handling purposes.

物質の分離¹⁹⁾²⁰⁾を除いてほとんど利用されておらず、もっぱらゲル充てんタイプのキャピラリー¹³⁾ないし、リニアポリマーを添加した高粘性電解液²¹⁾が用いられている。

CE では通常数 nl の試料を用いて分析を行う。従って装置には、再現性よく試料をキャピラリー末端に注入するためのガス加圧装置、真空吸引装置、あるいはサイフォンの原理に基づいたもの等の物理的な試料注入装置のいずれかと、電気泳動的な試料導入装置の二つが用意されている。これらの中で物理的試料注入法は試料中の塩濃度の影響をうけにくいという特徴があり、中空キャピラリーを使用する実験には有効であるが、DNA 分離に多用されるゲル充てんキャピラリーには、ゲルを破損してしまうので使用することはできない。ゲル充てんキャピラリーの場合には、電気泳動的試料導入法を使用する必要がある。しかしこの方法には、移動度の高い試料を選択的に導入してしまうという問題がつきまとう。特に塩濃度の高い試料の場合には塩のみを選択的に導入し、目的の試料成分は全く導入することができなかったということもありうるので注意が必要である。

CE では、質量分析計に接続するなどの特殊な場合を除き、キャピラリー上の末端に近い部分に検出器が装着されている。現在までに報告されている検出方法としては、紫外/可視吸収検出、スペクトラム検出、蛍光検

出、間接蛍光検出、発光検出、電気電導度検出、電気化学検出、ラジオアイソトープ検出等が挙げられる。これらの中で市販の装置に標準装備されているものとしては、主として紫外又は紫外/可視吸収検出器に限られ、一部の製品にダイオードアレイあるいはバイブレーティングミラーを利用したスペクトラム測定が可能なものが見られる程度である。最近ではオプションとしてレーザー誘導蛍光検出器 (LIF) を備える製品も市販されはじめた。このシステムでは、アルゴンレーザーを使用し、488 nm で蛍光色素を励起することにより、蛍光ラベルした DNA を紫外吸収検出器に比べ約 400 倍の感度で検出できることが報告されている²²⁾。

現在市販されている装置のほとんどは、なんらかの形でマイクロプロセッサを内蔵し、試料導入から、電気泳動、泳動後のキャピラリー洗浄を自動的に行えるようになっている。なかには、オートサンプラーを使用し、制御用パーソナルコンピュータに貯えた幾つもの異なる、複雑な泳動条件を指定した順番に実行することで、無人自動運転を可能にしたものも見られる。後述のように、電場こう配を利用して泳動する際には必須の機能といえよう。又、ほとんどの機種は分離データをパーソナルコンピュータに取り込み、記録及び解析ができる。100 分で数百ピークを検出し、同定するためには高速のデータ取り込み (20 Hz 程度) とスタンダードマーカーによる移動時間補正機能を備えたものが好ましいであろう。

DNA の分離に関しては分子ふるい効果を利用しようという見地からゲル充てんタイプのキャピラリーあるいはポリマー溶液が好んで使用されている。最近ではゲル充てんキャピラリーも各種性能のものが市販され、容易に DNA を対象としたサイズ分離ができるようになってきた。これらの細かい性状に関しては、メーカー各社から発行されているテクニカルインホメーション等を参照されたい。

3 オリゴ DNA の分離

オリゴ DNA の分離は、Karger らのグループにより 1988 年に報告²³⁾されて以来、ポリアクリルアミドゲルを充てんしたキャピラリーを用いて行われてきた。ゲル充てんキャピラリーを使用すれば、数百塩基までのオリゴ DNA を 1 塩基の長さの違いで分離できる^{6)~9)}。しかしこれらの実験に用いられた試料はほとんどの場合ホモポリマーであった。

Guttman らは $p(\text{dA})_{10}$, $p(\text{dC})_{10}$, $p(\text{dT})_{10}$ という 3 種類のホモポリマーを試料とし、泳動バッファーの pH

の分離に対する影響を調べ、それぞれのホモポリマーが異なった相対移動度を持つことを明らかにした²⁴⁾。

又、Weinberger らは $p(\text{dA})_{40\sim60}$, $p(\text{dC})_{15\sim20,24\sim36}$, $p(\text{dT})_{12\sim24}$ を試料とし、それぞれの塩基に関し、鎖長と移動時間の相関を求め、次のように定式化した²⁵⁾。

$$p(\text{dA})_n: t'(\text{A}_n) = 0.316n + 14.70$$

$$p(\text{dC})_n: t'(\text{C}_n) = 0.290n + 14.13$$

$$p(\text{dT})_n: t'(\text{T}_n) = 0.327n + 13.97$$

但し $t'(\text{X}_n)$ は X 塩基 n 個から成るホモポリマーの移動時間である。

これら Guttman ら、及び Weinberger らによる結果は、ヘテロジニアスなオリゴ DNA では鎖長だけでなく塩基組成が移動度に影響を与えていることを示唆したのとなった。Guttman らは、「ヘテロジニアスなオリゴ DNA の移動に要する時間（移動度の逆数）はそれを構成する各塩基のホモポリマーの移動時間の寄与分を足し合わせたものである」と仮定し、ヘテロジニアスなオリゴ DNA の移動時間を推定する計算式を提唱した²⁶⁾。すなわち $p(\text{dA})_{12\sim18}$, $p(\text{dC})_{12\sim18}$, $p(\text{dG})_{12\sim18}$, $p(\text{dT})_{12\sim18}$ の試料を泳動することにより、それぞれのホモポリマーに対する鎖長と移動時間の関係式として、例えば次のものを得た。

$$p(\text{dA})_n: t'(\text{A}_n) = 0.0161n + 0.7979$$

$$p(\text{dC})_n: t'(\text{C}_n) = 0.0182n + 0.7961$$

$$p(\text{dG})_n: t'(\text{G}_n) = 0.0071n + 0.9590$$

$$p(\text{dT})_n: t'(\text{T}_n) = 0.0205n + 0.9023$$

更にこの結果から、ヘテロジニアスなオリゴ DNA の移動時間 $t'(\text{A}_a\text{G}_g\text{T}_t\text{C}_c)$ は以下のように与えられるとした。

$$t'(\text{A}_a\text{G}_g\text{T}_t\text{C}_c) = \frac{a}{n} t'(\text{A}_n) + \frac{g}{n} t'(\text{G}_n) + \frac{t}{n} t'(\text{T}_n) + \frac{c}{n} t'(\text{C}_n)$$

但し a, g, t, c はオリゴ DNA を構成するそれぞれの塩基の数、 n はオリゴ DNA の鎖長である。

Guttman らは実際のヘテロジニアスなオリゴ DNA にこの理論式を適用し、理論値と実測値の誤差が 0.1% という非常によい一致をみた。

しかしこの方法を日常のオリゴ DNA の分析に利用する場合には、一つの大きな技術的困難がある。ゲル充てんキャピラリーを用いてオリゴ DNA を分析する場合、泳動の度にわずかながら移動時間がシフトしていくこと

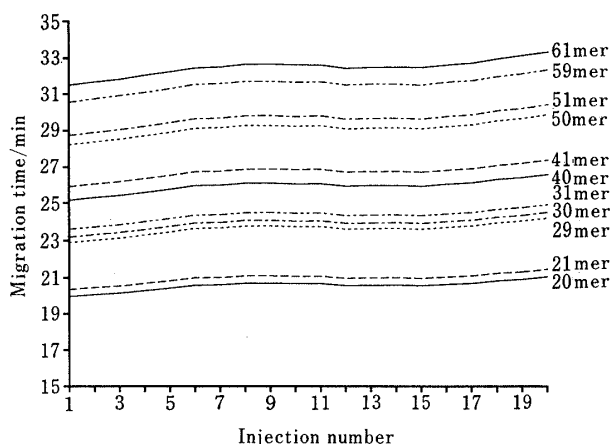


Fig. 2 Migration time shift during the first 20 successive runs¹⁰⁾

A newly prepared eCAP gel U100P capillary was subjected to the continuous separation of heterogeneous oligo DNA standard. Samples and experimental conditions were the same as in Fig. 3. Even after 100 injections, no serious reduction in resolution was observed.

が観察されている (Fig. 2)。そのため頻繁にホモポリマーを泳動し、各塩基ごとの鎖長と移動時間の関係係数を求め直さなくてはならない。4 種の塩基に対しそれぞれ数種の長さの異なるホモポリマーを用意し、数回の泳動を行い、更にデータ解析をすることを考えると、スタンダードを用意する経費もさることながら、作業効率が大幅に低下してしまうだろう。

そこで著者らは、21~61mer のスタンダードを数種類 (理論的には 6 種類) 用意し、試料 DNA と共に電気泳動し、その結果得られる観測方程式をガウスの最小二乗法 (未知数 5) を用いて解析してみた。次にその詳細について解説する。

3・1 ガウスの最小二乗法による移動時間の解析

前記 Guttman ら²⁴⁾²⁶⁾、及び Weinberger ら²⁵⁾による結果から、又著者らの予備的な実験 (Fig. 3, Table 1) でも 20mer と 21mer, 29mer と 30mer 及び 31mer, 40mer と 41mer, 50mer と 51mer というように 1mer ずつ長さの違うオリゴ DNA の移動時間の差に大きな違いがみられることから、ヘテロジニアスなオリゴ DNA の移動時間はオリゴ DNA の長さに依存するだけでなく、それを構成する塩基組成をも反映すると推定し、次の近似式で記述できると仮定した。

$$a[\text{A}] + g[\text{G}] + t[\text{T}] + c[\text{C}] + k = M_i \quad (1)$$

Table 1 Heterogeneous oligo DNA standards used for the experiments shown in Figs. 2 and 3.

Oligomer	Sequence
20mer	5'-AAGAAAGCAGCAACTGCATT-3'
21mer	5'-AGTACGTGCCAGTGCCAGCGT-3'
29mer	5'-ATTACAGTTCATCGTGCACAGCTTTCTGA-3'
30mer	5'-AGTTCATCGTGCTCAAATTTCTGATCATCG-3'
31mer	5'-GATCCGTTTTCAGGTCTGATTGAAAGCGGTAC-3'
40mer	5'-AGAGCATCAGATCACCTGGGACCCCATCGATGGACGCGTT-3'
41mer	5'-ATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTAC-3'
50mer	5'-CCTCCGGAAGTGGACGTTGACGACGAGCCAGAAGAAGAATAAGGATCCGG-3'
51mer	5'-TATTTATGGAGTTCAGACACTCAGCACAGCAGGGTCTCTGAGCTTATATAAT-3'
59mer	5'-CGGATGAGCTAAGGGATGAGGATGAGAGCAAGAGCAAAAGAAGGAGCAACAACCTTCATC-3'
61mer	5'-TCGAGATGAAGTTGTTGCTCCTTCTTTTGCTCTTCTCATCCTCATCCCTTAGCTCATC-3'

In most of the cases, the sample concentration was adjusted to 0.01~0.005 OD with water. In every injection, 40~60 μ l of sample solution in a modified polyethylene micro vial was used.

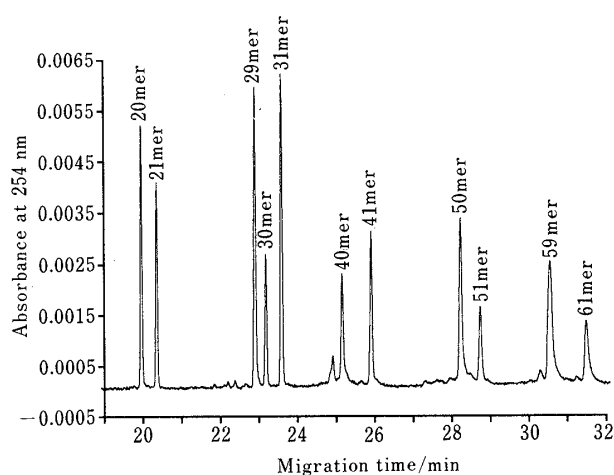


Fig. 3 Separation of heterogeneous oligo DNA standards¹⁰⁾

The actual sequences of oligo DNAs are summarized in Table 1. For the CE analysis, a Beckman P/ACE System 2100 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) was used. The gel filled capillary employed during the experiments was eCAP gel U100P (Beckman) of 37 cm total length and 100 μ m i.d. filled with polyacrylamide gel-7 M urea. Monitoring was done with an on-column UV detector at 254 nm. Sample was injected electrokinetically at 5 kV, 2 s. The electrophoresis was performed at 300 V/cm while the capillary was kept at 30°C during the experiments.

ここで a, g, t, c はそれぞれの塩基の移動時間に対する係数, $[A], [G], [T], [C]$ はオリゴ DNA に含まれる各塩基の数, k はオリゴ DNA の大きさに依存しない定数, M_i はオリゴ DNA の移動時間 (実測値) である。

式(1)中には変数は五つしか存在しないために、理論的には5種類の塩基組成の異なるオリゴ DNA (標準オリゴ DNA) を電気泳動し、その泳動結果から各塩基に対する移動時間の係数を求めることができるはずである。すなわち、5本のオリゴ DNA の電気泳動結果から次のような連立方程式を作り、解を求めればよい。

$$\begin{aligned}
 a[A]_1 + g[G]_1 + t[T]_1 + c[C]_1 + k &= M_{t1} \\
 a[A]_2 + g[G]_2 + t[T]_2 + c[C]_2 + k &= M_{t2} \\
 a[A]_3 + g[G]_3 + t[T]_3 + c[C]_3 + k &= M_{t3} \\
 a[A]_4 + g[G]_4 + t[T]_4 + c[C]_4 + k &= M_{t4} \\
 a[A]_5 + g[G]_5 + t[T]_5 + c[C]_5 + k &= M_{t5}
 \end{aligned} \quad (2)$$

ここで $[A]_i, [G]_i, [T]_i, [C]_i$ は i 番目の標準オリゴ DNA に含まれる各塩基の数, M_{ti} は i 番目の標準オリゴ DNA の移動時間 (実測値) である。

しかし実測値を用いて式(2)の連立方程式を作った場合には、実験に起因する誤差のために、一意的に解を求めることはできない。著者らは、実測値に含まれる実験誤差の影響を除去するためにガウスの最小二乗法を利用した¹⁰⁾。

ここで用いた最小二乗法は、通常使用されている1変数のための最小二乗法を5変数にまで拡張したもので、物理や化学あるいは土木工学における精密測定の整理のために使用されるものである²⁷⁾。オリゴ DNA の移動時間の解析のためのガウスの最小二乗法では六つ以上の観測値 (この場合には6種類以上の標準オリゴ DNA) を用いて、式(2)に相当する次のような観測方程式を作る。

$$\begin{aligned}
& a \left[\sum_{i=1}^n A_i A_i \right] + g \left[\sum_{i=1}^n A_i G_i \right] + t \left[\sum_{i=1}^n A_i T_i \right] \\
& \quad + c \left[\sum_{i=1}^n A_i C_i \right] + k \left[\sum_{i=1}^n A_i \right] = \left[\sum_{i=1}^n A_i M_i \right] \\
& a \left[\sum_{i=1}^n A_i G_i \right] + g \left[\sum_{i=1}^n G_i G_i \right] + t \left[\sum_{i=1}^n G_i T_i \right] \\
& \quad + c \left[\sum_{i=1}^n G_i C_i \right] + k \left[\sum_{i=1}^n G_i \right] = \left[\sum_{i=1}^n G_i M_i \right] \\
& a \left[\sum_{i=1}^n A_i T_i \right] + g \left[\sum_{i=1}^n G_i T_i \right] + t \left[\sum_{i=1}^n T_i T_i \right] \\
& \quad + c \left[\sum_{i=1}^n C_i T_i \right] + k \left[\sum_{i=1}^n T_i \right] = \left[\sum_{i=1}^n T_i M_i \right] \\
& a \left[\sum_{i=1}^n A_i C_i \right] + g \left[\sum_{i=1}^n C_i G_i \right] + t \left[\sum_{i=1}^n C_i T_i \right] \\
& \quad + c \left[\sum_{i=1}^n C_i C_i \right] + k \left[\sum_{i=1}^n C_i \right] = \left[\sum_{i=1}^n C_i M_i \right] \\
& a \left[\sum_{i=1}^n A_i \right] + g \left[\sum_{i=1}^n G_i \right] + t \left[\sum_{i=1}^n T_i \right] + c \left[\sum_{i=1}^n C_i \right] \\
& \quad + nk = \left[\sum_{i=1}^n M_i \right] \quad (3)
\end{aligned}$$

但し X_i は i 番目の標準オリゴ DNA に含まれる X の数, M_i は i 番目の標準オリゴ DNA の移動時間である。

従って、実験に用いたすべての標準オリゴ DNA (n 本) のすべての塩基に対し

$$\left[\sum_{i=1}^n A_i A_i \right] = A_1 A_1 + A_2 A_2 + A_3 A_3 + \cdots + A_n A_n$$

という処理をすることを表している。

このようにして作った観測方程式(3)を解くことによ

り、各塩基の移動時間に対する係数 (a, g, t, c) とオリゴ DNA の長さには依存しない定数 k とを求めることができる。

著者らが使用した 11 本のオリゴ DNA について上記方法で求めた移動係数と定数とを Table 2 に示しておく。

この結果より、オリゴ DNA の移動度は単に鎖長だけでなく、塩基組成によっていることが確認できた。

この方法の大きな特徴は、別の実験で求めた係数や定数を使用するのではなく、分析したい試料に標準オリゴ DNA を混入し、同時に電気泳動することで各係数と定数を求めることができるので、それほど多くの時間と経費をかけることなく、容易に、しかも常にその実験が行われたときのゲルの状態を反映した解析結果が得られるという点にある。又、移動時間の実測値と計算値との誤差は最も移動速度の速い C 1mer 分の移動時間変化 (0.16~0.17 min) よりも小さかったので、簡便な割にはかなりの精度で移動時間の推定ができることになる。

このようにして求めた係数を用いて分析したいオリゴ DNA 移動時間を計算することは有用である。今回著者らの使用したゲルでの典型的な塩基の移動時間の係数と定数とは、それぞれ 0.165 (c), 0.234 (a), 0.338 (g), 0.355 (t) 及び 15.078 (k) であった。そこで例えば $p(dC)_{40}$ と $p(dT)_{20}$ とを電気泳動すると、

$$p(dC)_{40}: 0.165 \times 40 + 15.078 = 21.678 \text{ (min)}$$

$$p(dT)_{20}: 0.355 \times 20 + 15.078 = 22.178 \text{ (min)}$$

となり、鎖長が 2 倍ある $p(dC)_{40}$ が $p(dT)_{20}$ よりも約 0.5 min 早く泳動してくることが予想される。

又、特殊な塩基配列を持ったオリゴ DNA の場合に

Table 2 Migration coefficients of 20 successive runs

Exp. #	a	g	t	c	k	DeltaM	DeltaC
1st	0.229	0.331	0.348	0.162	14.889	0.077	0.475
6th	0.238	0.343	0.360	0.166	15.345	0.079	0.476
11th	0.240	0.345	0.362	0.168	15.803	0.079	0.470
16th	0.240	0.345	0.363	0.169	15.353	0.076	0.450
20th	0.246	0.345	0.372	0.173	15.618	0.079	0.457
Average	0.238	0.343	0.361	0.168	15.309	0.078	0.464
Normalized	0.234	0.338	0.355	0.165	15.078	0.076	0.461

DeltaM: probable error of the migration time in min; DeltaC: probable error as the number of C. a, g, t and c are migration coefficients for A, G, T and C respectively and k is constant. The average migration coefficients (average) were calculated by averaging the migration times of each peak obtained by successive 20 runs, before Gauss's least square analysis of observation functions. For normalized in the chart, migration times of each peak of 20 successive runs were corrected by assuming the migration times of 61mer as 32 min before the analysis.

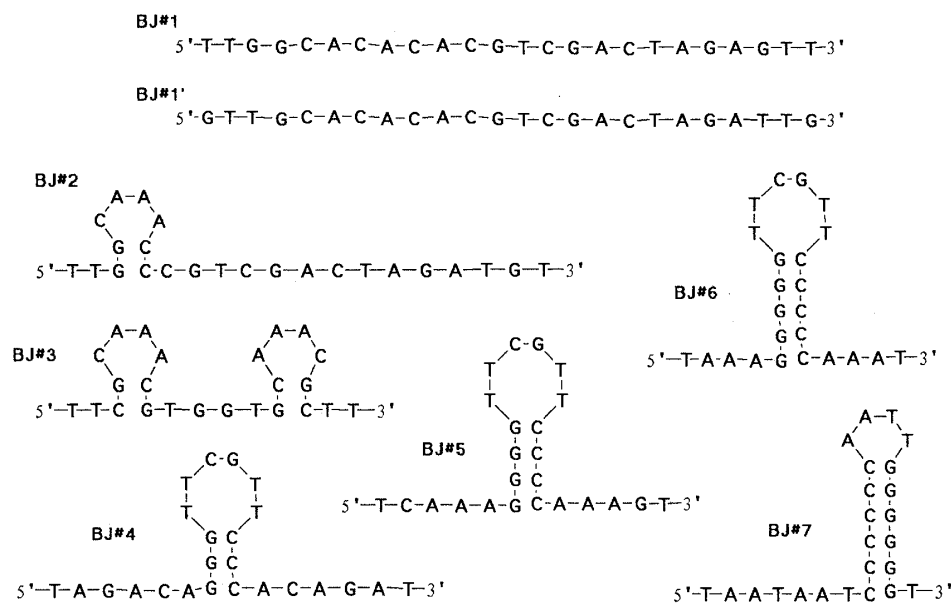


Fig. 4 Heterogeneous oligo DNA used in the analysis for the effect of secondary structure on migration time

Most probable secondary structures are illustrated¹⁰⁾.

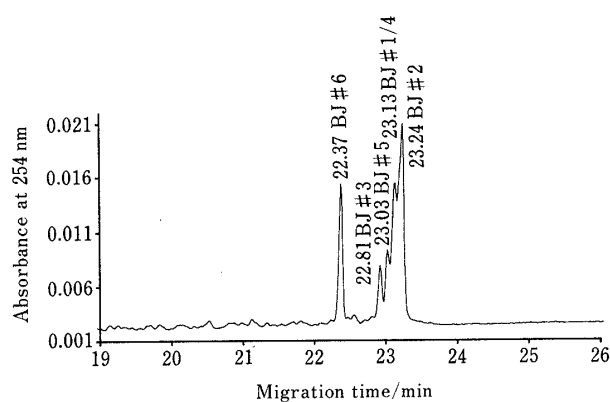


Fig. 5 Separation of heterogeneous oligo DNAs which may have secondary structures in the presence of 7 M urea¹⁰⁾

The actual sequences #1~#6 are summarized in Fig. 4 with possible secondary structures. Separation conditions were the same as in Fig. 3.

は、移動時間が計算値から大幅にずれることも認められた¹⁰⁾. すなわちオリゴ DNA の構造と移動時間との関連を調べるために、Fig. 4 に示すように鎖長が一定 (24 mer) で、しかも両端には T を持ち、各塩基を四つずつ持つオリゴ DNA を合成し、電気泳動を行ったところ、そのほとんどのものを分離することができた (Fig. 5). 更に移動時間の推定式から推測される移動時間と実

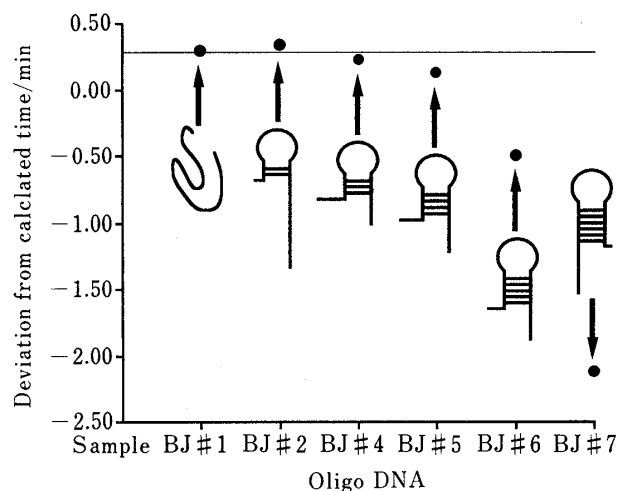


Fig. 6 Migration times and secondary structure¹⁰⁾

The migration time shifts are visualized plotting the deviation of actual migration time from calculated migration time *vs.* number of possible hydrogen bonds. Though we are not sure whether there were hydrogen bonds to maintain the secondary structure in the presence of 7 M urea in the case of rather small number of GC pairs, the reduction of migration time and increment in number of GC pairs are directly correlated. This strongly suggests that hydrogen bonds play an important role to bias the migration time most probably *via* secondary structure.

測値の間の時間的ずれと形成可能なヘアピン構造の大きさの間には密接な関係のあることが分かった (Fig. 6). 7 M 尿素の存在下でもオリゴ DNA は立体構造を取ることがうかがわせる報告もある²⁸⁾²⁹⁾が、真の原因は不明である。今後究明を要する課題である。

ところで著者らの用いたガウスの最小二乗法によるオリゴ DNA の移動時間解析では、標準オリゴ DNA を 12 本使用した場合には 500 回近い計算回数となる。簡単な掛け算、割算が中心ではあるが、間違いなく素早く行うことは不可能である。パーソナルコンピュータ上のスプレッドシートを用いて素早く計算できるようテンプレートを作っておくことを勧める。又、著者らの使用しているテンプレートを、数量に限りはあるが、希望者には研究目的のために供与する用意がある (テンプレートは Macintosh/Excel ver 4.0 J で作られたもの)。

3・2 オリゴ DNA 分析の応用

既にみてきたように、ゲル充てんキャピラリーを用いた CE は、単に鎖長や塩基組成の違いにとどまらず、塩基配列の違いまでを識別できる可能性がある。このような高分解能の応用の一例として、SSCP (single strand conformation polymorphism) の CE 化を挙げることができよう。一本鎖 DNA の高次構造は塩基配列に依存し、1 塩基置換によっても大きく高次構造が変化することがあり、それに伴って移動度も異なってくる。SSCP は、この高次構造の変化に伴う移動度の変化を利用した突然変異検出法で³⁰⁾比較的短い (<400 塩基) DNA 断片中の点突然変異を検出する有力な方法として広く受け入れられている。しかし Orita らによって開発されたオリジナルな方法³¹⁾は、大きなスラブゲルと試料の放射性同位元素 (RI) によるラベルとを必要としていたため、臨床検査のルーチンワークに利用するためには困難が付きまとった。その後、銀染色法³²⁾や蛍光ラベル法³³⁾も開発され RI を使用しなくてもよくなったが、ともに自動化には不向きな染色あるいはプレラベル化を必要としている。しかし CE を用いればスラブゲルを作る必要はなく、市販のゲル充てんキャピラリー (繰り返し使用可能) を利用することができる。又、DNA バンドの検出のためには、装置に組み込まれている UV 検出器を使用することができる。更にオートサンプラーを用いて試料を自動的に導入/分析することもできる。このように CE は SSCP のルーチン化に理想的な作業環境を提供するかにみえるが、全く問題がないわけではない。SSCP においては不安定な立体構造を持つ一本鎖 DNA を構造の違いで分離するために、電気泳動中のゲ

ルを低い温度に保つ必要がある。残念ながら現在市販されている CE 装置のなかには、SSCP に要求されるような低温を安定に保てるものは見受けられない。Mohabeer ら³⁴⁾は、Beckman 製の P/ACE 2000 キャピラリー電気泳動システムの温度コントロール部に改造を施し、必要な低温を保てるようにしたものを用いて、ヒト p53 tumor suppressor gene の第 7 エクソンにみられる多型を検出することに成功した。SSCP では、理想的にはオリゴ DNA はそれぞれに固有な 1 種類だけの立体構造をとり、その結果 1 本の泳動バンドとなることが好ましいが、実際には幾つかの準安定構造 (metastable structure) をとり、数本の泳動バンドが観察される場合もある。Mohabeer らも p53 tumor suppressor gene の第 7 エクソンで準安定構造を検出したが、むしろこれらの存在が点突然変異の同定に役立っていると結論している。Mohabeer らの使用したゲル充てんキャピラリーでは 1 回の泳動に約 30 分を要した。分析の確実を期すために野生型 (健康人) と突然変異体 (患者)、更に野生型と突然変異体とを混ぜ合わせたものを泳動すると、電気泳動だけでも 1 検体当たり約 90 分かかる。すなわち現在の 1 チャンネルの装置ではフル稼働しても 1 日当たり 16 検体しか分析できない。CE を遺伝子診断のためにルーチン的に使用することを考えると、マルチチャンネル化はぜひとも期待されることである。

4 二本鎖 DNA の分離

二本鎖 DNA の分離も、一本鎖であるオリゴ DNA の分離とほぼ同時に Cohen ら³⁵⁾によって報告された。彼らは 7 M 尿素と 0.1% SDS を含む変性存在下でフリーゾーン電気泳動を行うことにより、 λ DNA の *Hind III* 分解物と $\phi \times 174$ DNA の *Hae III* 分解物 {72~23130 塩基対 (bp)} の混合試料を、10 分以内に分離することができた。その後各種分離媒体の研究が盛んに行われ、

○ポリアクリルアミドゲルによる分子ふるい効果の利用¹¹⁾¹²⁾

○セルロース誘導体添加による粘性抵抗の利用^{36)~40)}

○アガロースゲルによる分子ふるい効果の利用⁴¹⁾

○グルコマンナンゲルによる分子ふるい効果の利用⁴²⁾

等、様々な試みがなされている。又、ゲルの網目構造の有無の分離に及ぼす影響の理論的考察もなされている²¹⁾。

ゲルキャピラリーをルーチン的に使用するためには、キャピラリーの長寿命化が一つの大きな課題となる。網目構造を有するポリアクリルアミドゲルキャピラリーの

場合には、スラブゲルと異なり、数回から数十回の繰り返し使用が可能である。しかしリニアなポリアクリルアミドゲルを使用すると、電気泳動ごとにゲルを交換しなければならないものの、CE 装置の電解液交換機能により自動的にゲルの交換を行うことができる機種もあるので、ゲル寿命の問題は克服できる。事実、装置メーカーの中にはリニアポリマーを中心に製品開発を進めているところも見受けられる。

又、分離媒体以外の電気泳動条件に関しても、例えばキャピラリー温度の分離に及ぼす影響⁴³⁾、電場こう配による分離の向上⁴⁴⁾、試料中にインターカレート試薬を添加することによる分離能の向上²²⁾、あるいはパルスフィールド法による巨大 DNA の分離¹¹⁾等が調べられている。

現在では、市販のゲルを利用して、比較的容易に数百塩基対で 1~2% の鎖長の違いで分離することができるようになった⁴⁵⁾。このような分離手法の応用分野としては、

- PCR (polymerase chain reaction) との組み合わせによる特定遺伝子の検出
- ARMS (amplification refractory mutation system) との組み合わせによる特定遺伝子での突然変異の検出
- RFLP (restriction fragment length polymorphism) による病気の診断や遺伝調査
- VNTR (variable number of tandem repeat) による個人識別と法医学診断

等を挙げることができる。これら DNA 解析の一般的な手法と遺伝子診断における意義は多くの成書がある⁴⁶⁾ので、そちらを参照されたい。ここでは、上記研究分野に CE を用いた例を幾つか紹介する。

4.1 PCR 法への応用

PCR 法とは、DNA ポリメラーゼと特異的なプライマーを利用し、目的遺伝子を 10 万倍にも増幅する手法である⁴⁷⁾ (Fig. 7)。この方法では、まず目的遺伝子を含んでいるかどうかを調べたい二本鎖 DNA 試料に、一組のプライマー (特定の遺伝子の上流及び下流領域に相補的な塩基配列を持つオリゴ DNA で通常 30 塩基程度の大きさ) を加え熱変性する (94°C) ことで試料 DNA を一本鎖にする (Fig. 7, step 1)、次いで試料溶液の温度を 37°C まで下げることで、一本鎖 DNA にプライマーを相補的に結合させる (アニーリング: Fig. 7, step 2)、更に試料溶液の温度を 72°C にまで上げ、DNA ポリメラーゼによる DNA の相補的合成を行う

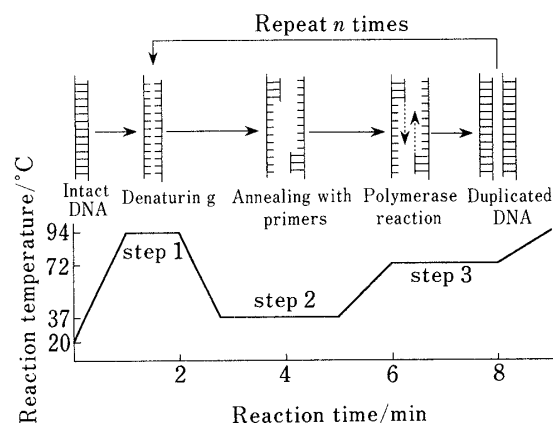


Fig. 7 Schematic diagram of PCR reactions

Temperature shifts (lower) and corresponding DNA structure in the reaction mixture (upper) are shown. For reaction procedure, see text.

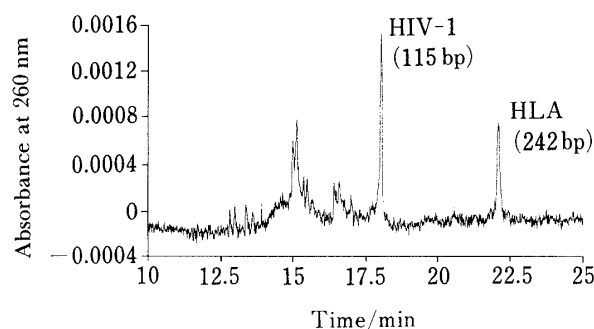


Fig. 8 Separation of PCR-co-amplified HIV-1 and HLA-DQ- α sequences⁴⁸⁾

Sample was a co-amplified HIV-1/HLA (target sequences 115 bp and 242 bp, respectively) positive control. Sample was injected electrokinetically for 10 s at 35 V/cm after sample concentration and desalting by ultracentrifugation. Buffer: 89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, (pH 8.5), 0.5% HPMC, 10 μ M EB; Capillary: DB-17-coated capillary (J & W Scientific, Folsom, CA, USA), 100 μ m i.d. $\times$ 57 cm in total length; Applied voltage: 175 V/cm; Temperature: 25°C; Detection: 260 nm

(Fig. 7, step 3). こうすることで、目的遺伝子を 2 倍に増幅することができる。更にこのプロセスを 20~30 回繰り返すことにより、目的遺伝子を理論的には 2^{20-30} 倍に増やすことができるわけである。PCR を行うための温度コントローラーも市販されている。この PCR 法の結果、DNA が増幅されたかどうか、又増幅された DNA が目的の遺伝子であるかどうかは、通常アガロースゲル電気泳動で DNA 断片の長さを分析し、確認していた。最近、Ulfelder ら⁴⁸⁾及び Mayer ら⁴⁹⁾は、

PCR 産物を CE で分析することにより、25 分以内に HIV (human immunodeficiency virus) 及び HLA (human leucocyte antigen) 遺伝子に由来する DNA を分離/確認することができた (Fig. 8). PCR 法ではときとして全く予期せぬ、無関係な遺伝子が増幅されることがあるので、正しく目的の遺伝子が増幅されていることを確認する必要があるが、CE では 1~2% 程度の鎖長の違いを区別できる⁴⁵⁾ので、CE の持つ高感度、高速、高分離能という特徴が生かされた好例と言えよう。

4・2 ARMS 法への応用

ARMS 法は、遺伝子の特定部分に既知の点突然変異があるかどうかを調べるための、特殊化した PCR 法の一つと言える (Fig. 9). ARMS 法では突然変異の存在部位をカバーするようなプライマーを二組設計する。このとき、一組のプライマー (Fig. 9, Primer W) は野生型のための遺伝子と相補的に結合し、もう一組 (Fig. 9, Primer M) のうち一つは目的の突然変異部位とのみ結合し、野生型とは結合しないようにする。これらのプライマーを用いてそれぞれ別個に反応させた試料を分析し、どちらのプライマーを使用した場合に生成物ができるかを調べることで、被検体が野生型か突然変異体かを知ることができる。Arakawa らは、フェニルケトン尿症の遺伝的解析に本手法を用い、遺伝子上の 1 塩基置換を検出することに成功した⁵⁰⁾。彼らはガスリー試験紙に塗布した新生児血液約 10.8 μ l を用いて PCR 反応を行ったが、1 回の反応では UV 検出器で検出できるだけの分量の産物を得ることができなかった。そこで最初は長めの DNA 断片を PCR 法で作製し、次いでこれを試料にして更に PCR 法を繰り返す、いわゆるネスティングという技法を用いた。Arakawa らは更に、PCR 産物にチアゾールオレンジというインターカレート試薬を加え、LIF で検出すれば 1 回の PCR 反応で必要量の産物が得られること、又 UV 検出器を使用した際にみられる反応試薬に起因する非常に大きなノイズピークも、LIF では全く認められなかったことも報告している。インターカレート試薬は蛍光を発するだけでなく、二本鎖 DNA の分離を向上させることが知られているので⁴⁸⁾、近い将来 LIF は二本鎖 DNA の検出において重要な役割を担うことになる。

4・3 RFLP 解析への応用

DNA 分解酵素の 1 種であるエンドヌクレアーゼの中には、DNA 中の特定の塩基配列 (5~8 bp) を識別し、その部位でだけ DNA を特異的に切断する制限酵素と呼

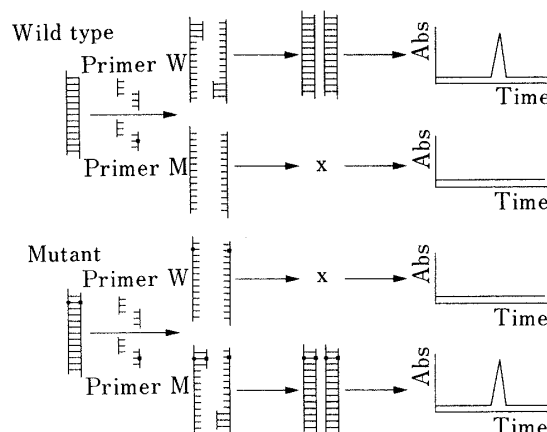


Fig. 9 Schematic diagram of ARMS

Four possible combinations and the results are illustrated. Note that only the combination of wild type-primer W and mutant-primer M give PCR products. Primer W and primer M stand for primer set for wild type and for mutants, respectively.

ばれるものが、500 種以上も見つかっている⁵¹⁾。例えば *Hind III* という制限酵素は A↓AGCTT (一本鎖だけ表示; ↓は切断位置) という塩基配列を識別し切断する。例えば、ある突然変異が遺伝子の挿入や欠失の結果であれば、その部分の DNA 断片の長さが挿入あるいは欠失に応じて増減する (Fig. 10, 上 1 段目と 3 段目の中央部分)。又、制限酵素の認識部位に点突然変異が起これば、野生型では起こるはずの切断が起こらなくなる (Fig. 10, 上 4 段目左から 2 番目のボックス)、あるいは本来切断されないはずの部位で切断が起こる (Fig. 10, 上 4 段目中央)。このように、制限酵素断片の長さのパターンを調べ、特定の病気との関連を調べることにより、遺伝子診断の指標とすることができる。又、特定の遺伝子の近傍の変化のみに注目する場合には、PCR 法により増幅した DNA に対して RFLP を行うこともある。特に後者の場合には生成する DNA 断片の数も少ないので、特殊なプローブを使用することなく電気泳動的に分離したバンドを直接検出することが可能である (Fig. 10, 下)。実際、PCR 増幅した RFLP 試料を CE で分離することが試みられ、Ulfelder ら⁵²⁾は ERBB2 Oncogene 由来の 1.1 kbp の PCR 産物を *Mbo I* という制限酵素で処理したときに 500 bp (A1 遺伝子ホモ接合体)、520 bp (A2 遺伝子ホモ接合体)、500/520 bp (A1/A2 遺伝子ヘテロ接合体) の三つのパターンが出現すること (Fig. 11) を確認できた。

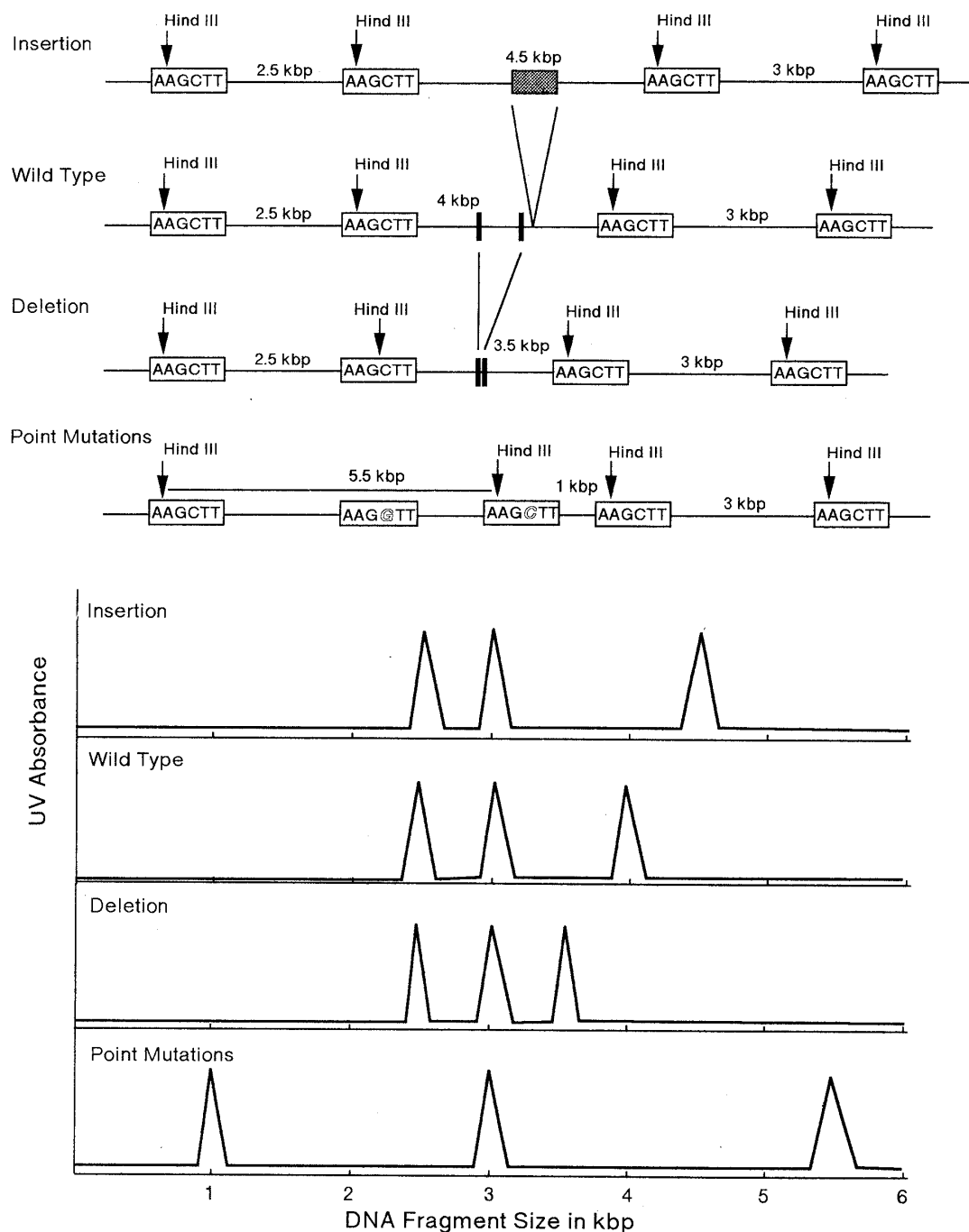


Fig. 10 Schematic diagram of RFLP

Hind III is chosen as the restriction enzyme. The changes in cutting sites (upper) and resulting DNA fragments (lower) are illustrated.

4.4 VNTR 解析への応用

ヒト染色体上の遺伝子をコードしていない部分（イントロン）に、一定の長さを持つ塩基配列が繰り返し並んでいること、しかも繰り返し数は個人によって異なるということが分かった (Fig. 12). これを VNTR と呼び、その多型性を利用し遺伝病などの遺伝子地図を作る

ためのマーカーとして利用している。又、この部位は個人識別にも有用であり、法医学における DNA 型分析法として実用化されはじめています。

笠井らの文献⁵³⁾には MCT 118 (繰り返し単位: 16 bp, 繰り返し数: 5~36), YNZ 22 (繰り返し単位: 70 bp, 繰り返し数: 1~30), ApoB (繰り返し単位:

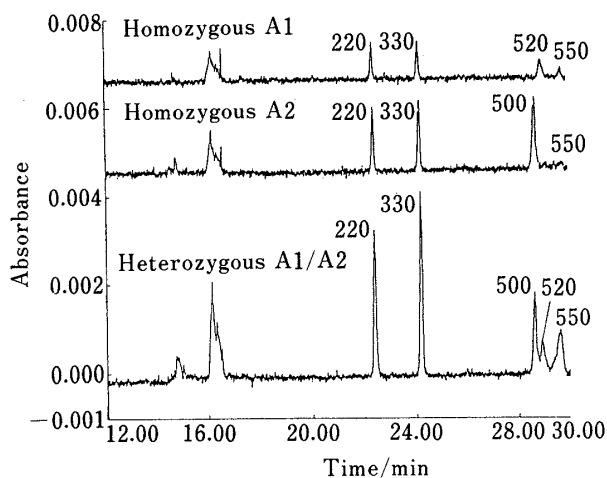


Fig. 11 CE separation of PCR-derived RFLP samples demonstrating MboI polymorphism⁵²⁾

Top, homozygous for allele A1 (520 bp fragment); middle, homozygous for allele A2 (500 bp fragment); bottom, heterozygous for allele A1 and A2. Constant fragments of 220, 330, and 550 bp can be seen in all three runs as a result of incomplete PvuII digestion of the 550 bp fragment. Conditions are the same as in Fig. 8.

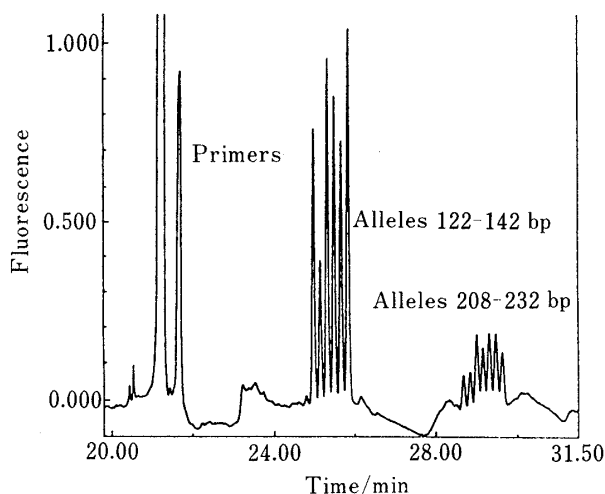


Fig. 13 CE separation of PCR-amplified MBP alleles demonstrating VNTR⁵⁵⁾

Sample was a mixture of 13 alleles from MBP locus. This is a binary system, containing two VNTRs, each with 4 bp repeats. Buffer: 100 mM Tris-borate, pH adjusted to 8.7 with CsOH, 0.1% HEC, 5 ng/ml YO-PRO-1, 1.27 μ M EB; Capillary: DB-17-coated capillary, 100 μ m i.d. $\times$ 67 cm in total length; Applied voltage: 13 kV; Temperature: 25°C; Detection: laser induced fluorescent detector (Ex: 488 nm, Em: 520 nm).

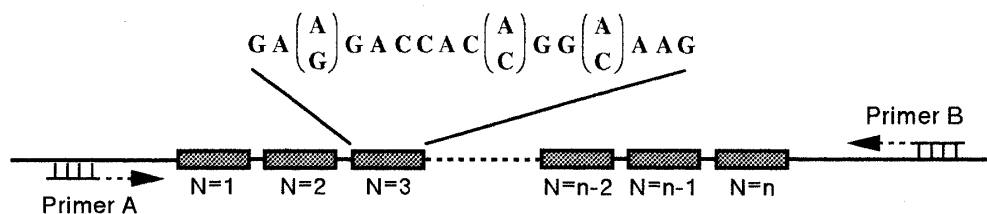


Fig. 12 Schematic diagram of VNTR (MCT118)

The length of PCR-products is determined by the number of repeats. In the case of MCT118, 15~36 repeats of 16 bases were observed. Since the number of repeats is determined genetically, one person has one (homozygote) or two (heterozygote) fixed lengths. Illustration based on the sequence shown in ref. 53.

14~16 bp, 繰り返し数: 29~51) 等, 繰り返し単位の大きなものについての, アガロースゲル電気泳動を利用した実験法の詳細な解説があるが, 最近の傾向としてはより短い繰り返し配列を利用した DNA 型分析に向かっているようである。

VNTR も微量の DNA 試料を用いて分析を行わなければならないので, まず PCR 法を用いて目的配列を増幅し, 次いでその産物の長さを決定することにより, 繰り返し数を求める。この場合, 繰り返し単位が短ければ

短いほど, 又繰り返し数が多ければ多いほど, 高い分離能が要求される。

McCord らは D1S80 (繰り返し単位: 16 bp, フラグメントサイズ: 403~1069 bp) 及び SE 33 (繰り返し単位: 2~4 bp, 最小フラグメントサイズ: 234 bp) を⁵⁴⁾, 又 4 塩基の繰り返し単位を含む 3 遺伝子座 (TC-11: 183~207 bp; vWA: 138~162 bp; MBP: 122~142 及び 208~232 bp) を⁵⁵⁾ HEC (hydroxyethyl-cellulose) を添加し, 粘性を上げた電解液系で 35 分以

内に分離することに成功した。ここでは1遺伝子座位に二つのVNTRを持つMBPの例をFig. 13に紹介する。VNTRは法医学鑑定で利用されることが多いので、多数の超微量検体について正確に繰り返し数を決定できる方法が要求されている。McCordらは、エチジウムブロミドとYoYo-1あるいはYO-PRO-1というインターカレート試薬を用い、蛍光検出を可能とすると同時に、分離能の向上も図っている⁵⁴⁾。

5 多重らせんの分離

最近、遺伝子発現の制御や染色体の構造と関連してDNAの多重らせん化が注目されている^{56)~58)}。CEはこの研究分野でも、*in vitro*のモデル実験系での多重らせん化の条件の検索等で重要な役割を果たすことが期待されるが、現在までのところあまり積極的に利用されているとはいえない状況にある。ここではCEを用いてKCl濃度とDNA四重らせん形成の関係を調べたScariaらの報告⁵⁸⁾があることを指摘するにとどめたい。

6 おわりに

著者らが行ったオリゴDNAの移動時間解析を中心に、CEによる核酸分離の歴史的経緯から、代表的な応用例までを紹介した。特に応用分野に関しては、DNAシーケンシング以外のものを意識的に取り上げた。これらの分野が近い将来ますます重要になってくると信ずるからである。CEは今後もますます発展し、多くの研究分野においてHPLCのように、あるいはそれ以上に重要な分析手法となることは夢ではないと思われる。この拙文が、いくらかでも読者の方々のCEに対する興味を喚起することができれば、望外の喜びである。

本総説の執筆に当たりBeckman Instruments Inc. (Fullerton, CA, USA)のDr. K. J. Ulfelderから貴重な助言と資料をいただいた。ここに謝意を表したい。

文 献

- 1) J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs: *Anal. Chem.*, **53**, 1298 (1981).
- 2) J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs: *Science* (Washington, D.C.), **222**, 266 (1983).
- 3) W. G. Kuhr: *Anal. Chem.*, **62**, 403R (1990).
- 4) W. G. Kuhr, C. A. Monnig: *Anal. Chem.*, **64**, 389R (1992).
- 5) S. F. Y. Li: "Capillary Electrophoresis", (1992), (Elsevier Sci. Pub., Amsterdam).
- 6) A. Guttman, A. S. Cohen, D. N. Heiger, B. L. Karger: *Anal. Chem.*, **62**, 137 (1990).
- 7) J. A. Luckey, H. Drossman, A. J. Kostichka, D. A. Mead, J. D'Cunha, T. B. Norris, L. M. Smith: *Nucleic Acids Res.*, **18**, 4417 (1990).
- 8) Y. Baba, T. Matsuura, K. Wakamoto, Y. Morita, Y. Nishitsu, M. Tsuchiko: *Anal. Chem.*, **64**, 1221 (1992).
- 9) B. Karger, A. Cohen: U.S. Patent 4 865 707 (1989).
- 10) T. Satow, T. Akiyama, A. Machida, Y. Utagawa, H. Kobayashi: *J. Chromatogr.*, **652**, 23 (1993).
- 11) D. N. Heiger, A. S. Cohen, B. L. Karger: *J. Chromatogr.*, **516**, 33 (1990).
- 12) Y. Baba, C. Sumita, K. Hide, N. Ishimaru, K. Samata, A. Tanaka, M. Tsuchiko: *J. Liquid Chromatogr.*, **16**, 955 (1993).
- 13) 馬場嘉信: 蛋白質 核酸 酵素, **38**, 2243 (1993).
- 14) A. S. Cohen, D. R. Nagarian, B. L. Karger: *J. Chromatogr.*, **516**, 49 (1990).
- 15) X. C. Huang, M. A. Quesada, R. Mathies: *Anal. Chem.*, **64**, 2149 (1992).
- 16) H. Swerdlow, J. Z. Zhang, D.Y. Chen, H. R. Harke, R. Grey, S. Wu, N. J. Dovichi, C. Fuller: *Anal. Chem.*, **63**, 2835 (1991).
- 17) S. L. Pentony, K. D. Konrad, W. Kaye: *Electrophoresis*, **13**, 467 (1992).
- 18) S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando: *Anal. Chem.*, **57**, 834 (1985).
- 19) J. Liu, J. F. Banks, Jr., M. Novotny: *J. Microcolumn Separat.*, **1**, 136 (1989).
- 20) Beckman Datasheet: DS-738A & A-1726 (Beckman Instruments Inc.) 1990.
- 21) Y. C. Bae, D. Soane: *J. Chromatogr.*, **652**, 17 (1993).
- 22) H. Schwartz, K. Ulfelder: *Anal. Chem.*, **64**, 1737 (1992).
- 23) A. S. Cohen, D. R. Najarian, A. Paulus, A. Guttman, J. A. Smith, B. L. Karger: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 9660 (1988).
- 24) A. Guttman, A. Arai, K. Magyar: *J. Chromatogr.*, **608**, 175 (1992).
- 25) S. R. Weinberger, T. Schlabach: HPCE'91 Poster (1991), San Diego.
- 26) A. Guttman, R. J. Nelson, N. Cooke: *J. Chromatogr.*, **593**, 297 (1992).
- 27) 一瀬正巳: "誤差論", (1953), (培風館).
- 28) A. Paulus, J. I. Ohms: *J. Chromatogr.*, **507**, 113 (1990).
- 29) K. D. Konrad, S. L. Pentoney, Jr.: *Electrophoresis*, **14**, 502 (1993).
- 30) 林 健志: 蛋白質 核酸 酵素, **35**, 3085 (1990).
- 31) M. Orita, H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, T. Sekiya: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 2766 (1989).
- 32) B. Dockhorn-Dwoniczak, B. Dwarniczak, L. Brommelkamp, J. Bulles, J. Horst, W. W. Bocker: *Nucleic Acids Res.*, **19**, 2500 (1991).
- 33) R. Makino, H. Yazyu, Y. Kishimoto, T. Sekiya, K. Hayashi: PCR Methods and Applications 2, 10 (1992).

- 34) A. J. Mohabeer, S. Rampal, W. J. Martin: Beckman Instruments Inc. internal information, in preparation.
- 35) A. S. Cohen, D. Najarian, J. A. Smith, B. L. Karger: *J. Chromatogr.*, **458**, 323 (1988).
- 36) M. Strege, A. Lagu: *Anal. Chem.*, **63**, 1233 (1991).
- 37) S. Nathakarnkitkool, P. J. Oefner, G. Bartsch, M. A. Chin, G. K. Bonn: *Electrophoresis*, **13**, 18 (1992).
- 38) A. E. Barron, D. S. Soane, H. W. Blanch: *J. Chromatogr.*, **652**, 3 (1993).
- 39) R. P. Singhal, J. Xian: *J. Chromatogr.*, **652**, 47 (1993).
- 40) D. A. McGregor, E. S. Yeung: *J. Chromatogr.*, **652**, 67 (1993).
- 41) P. Bocek, A. Chrambach: *Electrophoresis*, **13**, 31 (1992).
- 42) T. Izumi, M. Yamaguchi, K. Yoneda, T. Isobe, T. Okuyama, T. Shinoda: *J. Chromatogr.*, **652**, 41 (1993).
- 43) A. Guttman, N. Cooke: *J. Chromatogr.*, **559**, 285 (1991).
- 44) A. Guttman, B. Wanders, N. Cooke: *Anal. Chem.*, **64**, 2348 (1992).
- 45) Beckman Datasheet eCap ds1000/LIF ds1000, (1993), (Beckman Instruments Inc.).
- 46) 野島 博: “遺伝子診断入門”, (1992), (羊土社).
- 47) 榎 佳之: 実験医学, **8**, 1008 (1990).
- 48) K. J. Ulfelder, H. E. Schwartz: Beckman Datasheet DS-810, (1991), (Beckman Instruments Inc.).
- 49) A. Mayer, F. Sunzeri, T-H. Lee, M. P. Busch: *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **115**, 1228 (1991).
- 50) H. Arakawa, K. Uetanaka, M. Maeda, A. Tsuji: *J. Chromatogr.*, **664**, 89 (1994).
- 51) 村松正實訳: “遺伝子工学小辞典”, (1991), (丸善).
- 52) K. J. Ulfelder, H. E. Schwartz, J. M. Hall, F. J. Sunzeri: *Anal. Biochem.*, **200**, 260 (1992).
- 53) 笠井賢太郎, 向山明孝: 蛋白質 核酸 酵素, **35**, 3150 (1990).
- 54) B. R. McCord, J. M. Jung, E. A. Holleran: *J. Liquid Chromatogr.*, **16**, 1963 (1993).
- 55) B. R. McCord, D. L. McClure, J. M. Jung: *J. Chromatogr.*, **652**, 75 (1993).
- 56) K. Yoon, C. A. Hobbs, J. Koch, M. Sardaro, R. Kutny, A. L. Weis: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 3840 (1992).
- 57) R. W. Roberts, D. M. Crothers: *Science* (Washington, D.C.), **258**, 1463 (1992).
- 58) P. V. Scaria, S. J. Shire, R. H. Shafer: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **89**, 10336 (1992).



Analysis of DNA by capillary electrophoresis. Takashi SATOW (Beckman Instruments (Japan) Ltd., 6, Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102; Present address: Immunocytometry Systems, Nippon Becton-Dickinson Company, Ltd., 8-5-34, Akasaka, Minato-ku, Tokyo 107)

Recent advances in the separation of oligo DNA fragments using capillary electrophoresis (CE) were reviewed with special emphasis on the historical aspects and possible applications of the technology in the near future. In the section on single strand DNA separation, the high resolution capability of CE was demonstrated by referring to the size separation of oligo DNA in which a 1mer difference in size of several hundreds base-mer can be recognized by using a polyacrylamide gel-filled capillary or high viscosity buffer. In addition, a statistical analysis of the migration time of heterogeneous oligo DNA was shown. By employing Gauss's least square method, the estimated migration time of any known sequences having no secondary structure can be calculated with probable error of less than 0.08 min. The effect of the secondary structure on separation was shown. The possibility of using these secondary structure effects on migration time for doing SSCP (single strand conformation polymorphism) was indicated. The section on double strand DNA separation focussed mainly on the application of CE. The possibility of detecting a specific gene or points mutation, or doing genetic diagnosis and paternal analysis was shown by referring to example of CE application to PCR (polymerase chain reaction) product analysis, ARMS (amplification refractory mutation system) analysis, RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis, and VNTR (variable number of tandem repeat) analysis.

(Received December 24, 1993)

Keyword phrases

capillary electrophoresis; oligo DNA; single strand DNA; double strand DNA; mobility.