

# QIAxcel™ システムを用いた VNTR 分析のハイスループット処理

Akio Aono, Kinuyo Chikamatsu, and Satoshi Mitarai

Mycobacterium Reference and Research, Research Institute of Tuberculosis, Tokyo, Japan

QIAxcel システムにより自動計算されるフラグメントサイズから、反復配列多型 (variable number tandem repeat ; VNTR) のコピー数を算出した。QIAxcel システムにより得られた結果は結核菌型判別を可能にした。

## はじめに

JATA ローカス中の反復配列のコピー数は結核菌の株間で異なる (1)。増幅した PCR 産物の分子量と繰り返し配列のコピー数は直接的な相関関係にあるため、正確な分子量を測定することによって結核菌型を迅速かつハイスループットで識別することが可能である。

## 材料および方法

### 結核菌株、DNA 精製、PCR 増幅

192 株の結核菌分離株ならびに H37Rv 結核菌標準株のゲノム DNA を、ISOPLANT Kit (NIPPON GENE) を用いて精製した。増幅反応は、精製した DNA (1  $\mu$ l)、プライマー (各 25 pmol)、dNTPs (各 200  $\mu$ M)、GC buffer I (Takara Bio, Inc.)、Takara® EX Taq DNA polymerase (0.5 U, Takara Bio, Inc.)、蒸留水 (6.3  $\mu$ l) で調製した。15 種類の JATA のローカスに対応するプライマーを用いた。増幅反応は次のようなサイクリング条件で行なった：まず 94°C で 5 分の変性を行なった後、94°C で 30 秒、63°C で 30 秒、72°C で 3 分のサイクルを 35 回繰り返した。

### 分子量の測定

特に断りのない限り、増幅反応は 5 倍容量の QX DNA Dilution Buffer (QIAGEN®) で希釈した。希釈した PCR 産物を QIAxcel DNA High Resolution Kit を用いて QIAxcel システムで分析した。分離は 10 秒間の注入時間と 2100 秒の分離時間を用いて OM2100 メソッドで行なった。BioCalculator Software を用いて DNA の分子量と濃度を自動的に測定した。

分子量測定の正確さと再現性を調べるために、コントロールとして 100 bp DNA Ladder (Toyobo) を QIAxcel システムで分析した。

### 分子量から反復配列のコピー数を換算

JATA ローカスを増幅した PCR 産物の分子量を、反復配列のない PCR 産物の分子量、反復配列の長さ、ローカス中のコピー数から計算した (表 1)。このデータを用いて、増幅産物の分子量から反復配列のコピー数を算出することができる。

表 1. JATA 増幅産物の分子量の換算値

JATA no.	Name	Locus	Repeated unit	Size (bp)															
				0	1	2	3	Amplified fragment (according to number of tandem repeats)											12
1	Mtub 04	0424	51	535	586	637*	688	739	790	841	892	943	994	1045	1096	1147	1198	1249	1300
2	MIRU 10	0960	53	483	536	589	642*	695	748	801	854	907	960	1013	1066	1119	1172	1225	1278
3	Mtub 21	1955	57	208	265*	322	379	436	493	550	607	664	721	778	835	892	949	1006	1063
4	Mtub 24	2074	56	14	70	126	182	238*	294	350	406	462	518	574	630	686	742	798	854
5	QUB 11b	2163b	69	200	269	338	407	476	545*	614	683	752	821	890	959	1028	1097	1166	1235
6	VNTR 2372	2372	57	176	233	290*	347	404	461	518	575	632	689	746	803	860	917	974	1031
7	MIRU 26	2996	51	285	336	387	438*	489	540	591	642	693	744	795	846	897	948	999	1050
8	QUB 15	3155	54	71	125	179	233	287*	341	395	449	503	557	611	665	719	773	827	881
9	MIRU 31	3192	53	491	544	597	650*	703	756	809	862	915	968	1021	1074	1127	1180	1233	1286
10	QUB 3336	3336	59	98	157	216	275	334	393	452	511	570*	629	688	747	806	865	924	983
11	QUB 26	4052	111	168	279	390	501	612	723*	834	945	1056	1167	1278	1389	1500	1611	1722	1833
12	QUB 4156	4156	59	510	569	628	687*	746	805	864	923	982	1041	1100	1159	1218	1277	1336	1395
13	QUB 18	1982	78	231	309	387	465	543	621*	699	777	855	933	1011	1089	1167	1245	1323	1401
14	QUB 11a	2163a	69	170	239	308*	377	446	515	584	653	722	791	860	929	998	1067	1136	1205
15	ETR A	2165	75	184	259	334	409*	484	559	634	709	784	859	934	1009	1084	1159	1234	1309

引用文献の表を基に作製。

\* 結核菌 H37Rv 株のゲノム DNA から増幅した産物の分子量。

### 結果

QIAxcel システム (図 1) およびアガロースゲルの目視判定 (データ未提示) により、15 種類の JATA ローカスから増幅したフラグメントを 192 株の結核菌について分析した (トータルで 2,880 種類の分析)。表 1 のデータに従って、フラグメントサイズから反復配列のコピー数を算出した。

QIAxcel システムを用いたフラグメントサイズの自動計算は、1,000 bp 未満のフラグメントに関しては 100% 正確である (全体の 92.3% にあたる 2658 フラグメントが 1,000 bp 未満に相当)。しかし、JATA 5 (VNTR2163b)、JATA 10 (VNTR3336)、JATA 11 (VNTR4052)、JATA 14 (VNTR2163a)、JATA 15 (QUB18) ローカスから増幅した 1,000 bp を超えるフラグメントに関しては不一致が観察され、分析した株のそれぞれ 0.5%、2.1%、54.7%、9.4%、49.5% に相当する。

分子量の自動計算に DNA 濃度が与える影響を調べるために、既知の増幅産物を異なる濃度に希釈して分析した (図 2)。高濃度フラグメントでは低濃度フラグメントよりも広いバンドがゲルイメージで現れた。この結果、高濃度の計算値は実際の値より低くなった (表 2)。この傾向は分子量の大きなフラグメントで強く観察された。

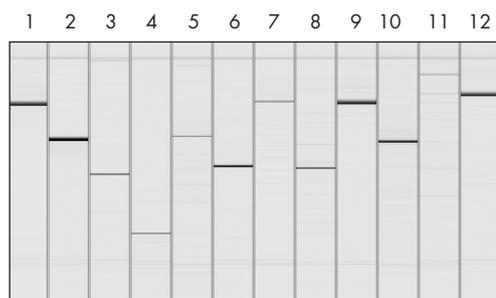


図 1. 結核菌 JATA ローカスの増幅産物を QIAxcel システムにより分離・分析  
結核菌分離株からの DNA を、JATA 1 ~ 12 ローカスに対応したプライマーを用いて増幅後、分析した。

表 2. PCR 産物希釈液の分子量測定

Actual fragment size (bp)	Calculated fragment size (bp)				
	Dilution				
	1 : 1	1 : 2	1 : 5	1 : 10	1 : 20
591	531.8	541.7	550.3	558.2	562.7
1028	846.1	877.9	937.1	961.0	981.1
1496	999.1	1069.7	1166.0	1273.3	1311.7

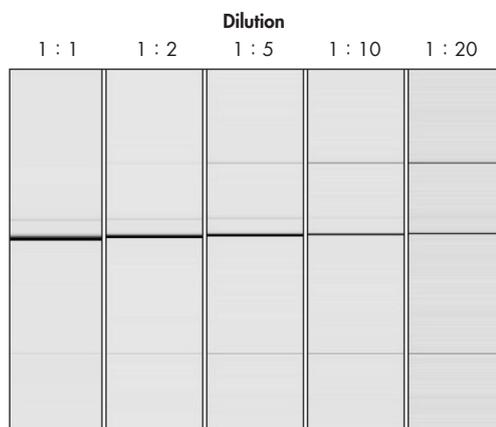


図 2. 濃度により異なる分子量  
JATA 10 ローカス用プライマーを用いて、結核菌分離株 H37Rv から DNA を増幅、表記のように希釈して分析した。

表 3. 100 bp マーカーの分子量

Actual (bp)	Calculated (bp)*	Standard deviation
1500	1557.9	19.3
1000	1061.8	2.7
900	922.3	1.4
800	809.7	1.3
700	699.1	1.1
600	598.4	1.2
500	494.6	1.1
400	399.0	1.1
300	301.5	0.9
200	203.8	0.7
100	100.4	0.8

\* 96 回測定した平均値。

## 考察

QIAxcel システムにより自動計算した分子量を、JATA ローカスのコピー数算定に使用した。2 種類の因子：DNA 濃度およびフラグメントサイズが分子量測定精度に影響した。

高濃度ではフラグメントサイズが実際の値よりも少なく計算された。この傾向はフラグメントが 1,000 bp を超えると顕著になった。これらの結果から正確なフラグメントサイズを測定するために、1,000 bp を超えるフラグメントに関しては希釈して分析することを推奨する。さらに、既知の分子量を持つ標準株を未知の株と同時に分析することにより、長いフラグメントの分子量を較正することを推奨する。

短いフラグメントでは、ほぼ同じサイズのアライメントマーカがある場合、計算を間違える可能性がある。この場合は、アライメントマーカのピークをマニュアルで編集あるいは削除し、正確な分子量を測定する。QIAxcel システムからのデータをエクスポートする前に、短いアライメントマーカが正確に認識されていること、また増幅フラグメントのサイズと濃度をチェックすることを推奨する。

## 結論

- QIAxcel システムにより結核菌の VNTR 分析を迅速にハイスループットで行なえた。
- QIAxcel システムを用いた VNTR 分析は、汎用されているアガロースゲルを用いたマニュアル分析（データ未提示）に比べてエラーが少なく労力もかからない。
- 推奨に従うと大小フラグメントの分子量計算を正確に行なえる。

## 引用文献

1. Maeda, S., Murase, Y., Mitari, S., Sugawara, I., and Kato, S. (2007) Rapid, simple genotyping method by the variable numbers of tandem repeats (VNTR) for Mycobacterium tuberculosis isolates in Japan — analytical procedure of JATA (12) VNTR. *Kekkaku* **83**, 673.

記載の製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) の “Trademarks and Disclaimers” をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) から入手可能です。

ゲル電気泳動の自動化に関しては [www.qiagen.com/QIAxcelAdvJP](http://www.qiagen.com/QIAxcelAdvJP) をご覧ください。

Trademarks: QIAGEN®, QIAxcel™ (QIAGEN Group); Takara® (Takara Shuzo Co., Ltd.).

製品情報、仕様、カタログ番号 (Cat. no.)、価格等は予告なく変更場合がございます。予めご了承ください。© 2016 QIAGEN, all rights reserved.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

株式会社 キアゲン | 〒104-0054 | 東京都中央区勝どき3-13-1 | Forefront Tower II  
Tel:03-6890-7300 | Fax:03-5547-0818 | E-mail:techservice-jp@qiagen.com