



Application

PCR法によるアルデヒド脱水素酵素のSNP解析

製品名 KAPATaq EXtra PCR Kit (Cat No. KK3009)

メーカー名 KAPA BIOSYSTEMS

製品名 ミドリグリーンアドバンス (Cat No. NE-MG04)

メーカー名 日本ジェネティクス株式会社

製品名 FAS-Nano (Cat No. FAS-Nano)

メーカー名 日本ジェネティクス株式会社

下記のデータは、東京医科大学 生化学分野 高野 直治 様、森谷 昇太 様のご厚意により掲載させて頂きました。

はじめに

本アプリケーションノートでは「お酒に強い」「弱い」を決定するアルデヒド脱水素酵素 (ALDH2) 遺伝子のSNP (※1) を題材としています。

※1: SNPとは?

ヒトとヒトのDNAの配列は、99.9%が同じであり、0.1%の遺伝情報の違いが、個人間の顔や体型、体質、性格の違いなど、ヒトの多様性を生み出していると考えられています。

一塩基多型 (SNP) は遺伝子の塩基配列が1カ所だけ異なっている状態を指し、SNPのタイプにより、酵素などの生体内タンパク質の働きが微妙に変化することが知られています。

SNPにより病気への罹り易さや、医薬品への反応に差が出ることが知られており、医療分野ではSNPを元に患者個人に最適な治療方法を計画する「オーダーメイド医療」の開発が期待されています。

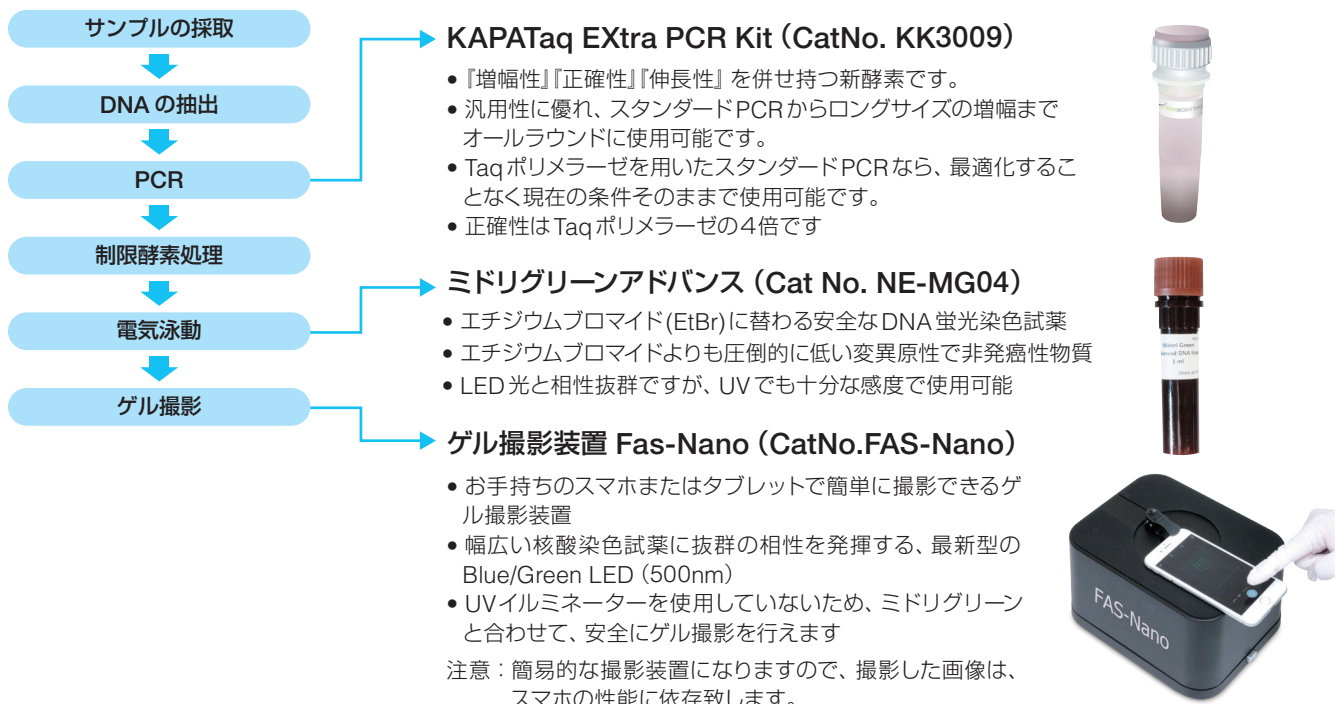
実験

今回の実験では、頬粘膜細胞からゲノムDNAを抽出し、PCR法によりアルコール代謝に関わる、ALDH2遺伝子を増幅させます。その後、増幅断片を制限酵素で処理し、アガロース電気泳動でALDH2の遺伝型を判定することで、お酒の強さを確認致します。

参考文献: Helminen A, Väkeväinen S, Salaspuro M.

ALDH2 genotype has no effect on salivary acetaldehyde without the presence of ethanol in the systemic circulation. PLoS One. 2013;8:e74418.

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772811/>)



実験方法

● サンプル

インフォームド・コンセントが得られたヒトから口腔粘膜を生理食塩水にて回収し、InstaGene (BIO-RAD) にてゲノムDNAを抽出した

PCR反応

● PCR 反応組成液

| | |
|---|--------|
| KAPATaq EXtra DNA ポリメラーゼ (5U/μL) | 0.2 μL |
| 5×KAPATaq EXtra バッファー (Mg ²⁺ free) | 8 μL |
| 25mM MgCl ₂ | 2.8 μL |
| dNTP Mix (10mM each) | 1 μL |
| PrimerF (10μM) | 2 μL |
| PrimerR (10μM) | 2 μL |
| Template DNA | 20 μL |
| PCR grade Water | 4 μL |
| total | 40 μL |

● サーマルサイクラー条件

| | | | |
|-------------------|------|-------|-------------|
| Taqの活性化、鋳型DNAの熱変性 | 94°C | 5min | } 40 cycles |
| 熱変性 | 94°C | 30sec | |
| アニーリング | 60°C | 30sec | |
| 伸長 | 72°C | 60sec | |
| 最終伸長 | 72°C | 2min | |

サーマルサイクラー：BIO-RAD MyCycler

● プライマー配列

Forwardプライマー：TCAAATTACAGGGTCAACTGCT
Reverseプライマー：GGCTGGGTCTTTACCCTCTC

参考文献：Helminen A, Väkeväinen S, Salaspuro M. ALDH2 genotype has no effect on salivary acetaldehyde without the presence of ethanol in the systemic circulation. PLoS One. 2013;8:e74418.

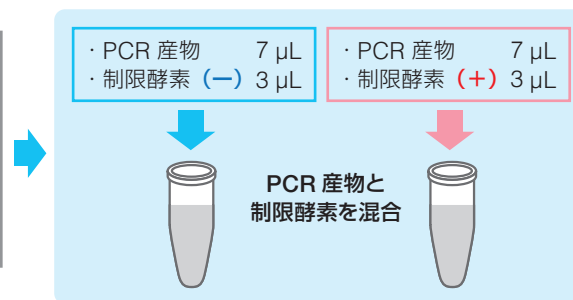
制限酵素処理

| 制限酵素 (-) | | 制限酵素 (+) | |
|------------------------------|--------|------------------------------|--------|
| 超純水 | 2.8 μL | 超純水 | 2 μL |
| 10xCutSmart Buffer | 1.6 μL | 10xCutSmart Buffer | 1.6 μL |
| 1.6mM S-adenosyl-methionine* | 0.4 μL | 1.6mM S-adenosyl-methionine* | 0.4 μL |
| total | 4.8 μL | Acu I | 0.8 μL |
| | | total | 4.8 μL |

※ 最終濃度 40μM

Acu I：NEB社

10xCutSmart BufferとS-adenosyl-methionineはAcu Iに付属
S-adenosyl-methionineは1.6mMをストック溶液とした



電気泳動

アガロース：アガロース (日本ジェネティクス：Cat No.NE-AG01)

核酸染色試薬：ミドリグリーンアドバンス (日本ジェネティクス：Cat No.NE-MG04)

電気泳動条件：100V

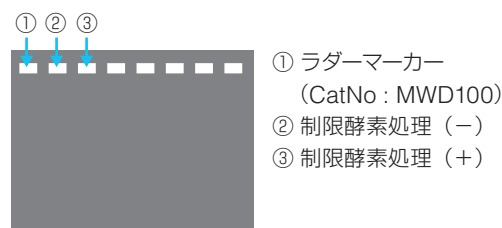
ゲル全体の1/2まで進んだら泳動を停止する。

バッファー：TBE

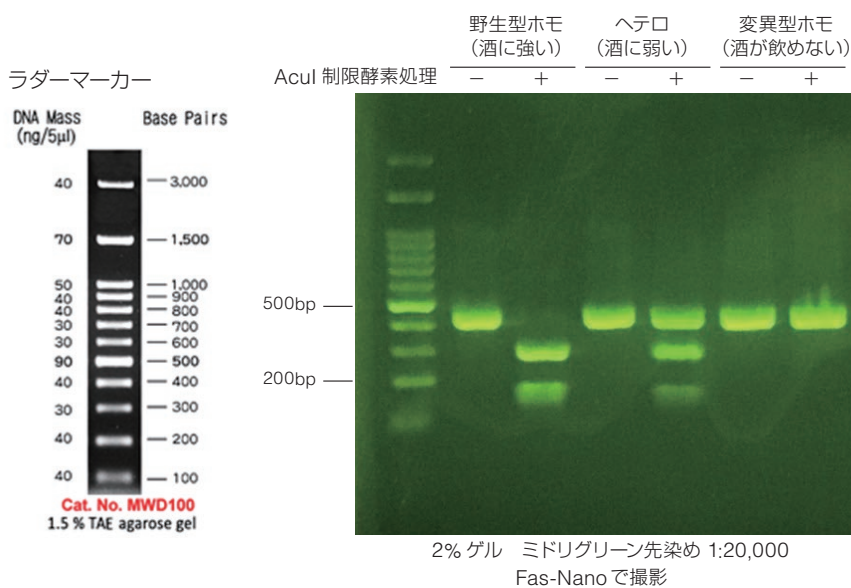
電気泳動装置：Mupid-2plus

Loading Dyeはニッポンジーン：313-90111 (SDS含有, BPB, XC) SDS含有のほうが綺麗な実験結果が得られています。

特に、この実験は泳動サンプルにTaq, 制限酵素などの不純物が多く入りますので、SDS入りを使わないとバンドパターンが乱れてしまう可能性があります。



実験結果



3種の遺伝子型の電気泳動結果のパターンを掲載する。

Aculによる制限消化前は、いずれも430bpのPCR増幅産物が確認された。

制限酵素 Acul 処理により、野生型ホモでは296bpと134bpの断片が生じた。

一方、変異型ホモ (ALDH2-1の114塩基目のGがAに置換) では、Aculの認識部位が変異を起こしているため、430bpのまま切断されなかった。ヘテロでは、430bp、296bp、134bp両方のバンドが確認された。

※結果の電気泳動写真は、全てのバンドパターンを確認するためクローニングを行ったポジティブコントロールにて電気泳動を行っています。

学生実習に使用しましたが、FAS-Nanoを使ったシステムは学生が自分のスマホで写真を撮り、データを持ち帰り、いつでも写真を見られるため少しうれしそうでした。ただ、スマホの性能に写真の質が依存してしまうので綺麗な写真を撮れないこともあるようでした。(高野 様)

学生実習 (学生120名) を行うにあたり、経費削減の観点からコストパフォーマンスに優れたPCRキットを探していました。

そこで、KAPATaq EXtra PCRキットを試してみたところ、良好な実験結果が得られました。(なお、近年ではdNTPやバッファーなどがすでに混ざってセットになったタイプも市販されていますが、本品は別々になっていることから学生実習でそれぞれの試薬が持つ意味を教育する観点からも選択しました。)

KAPATaq EXtra PCRキットは、非常にコストパフォーマンスに優れていると思います。

Fas-Nanoを使うことにより、エチプロフリーで安全な実習を行えたこともよかったです。(森谷 様)



お客様のコメント