



Application

ChIP (クロマチン免疫沈降) サンプルにおける高GC含量 (76.8%) ターゲット領域のqPCR条件の最適化

製品名

KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KK4601, KK4602)

メーカー名

KAPA BIOSYSTEMS 社

はじめに

クロマチン免疫沈降法 (ChIP : Chromatin immunoprecipitation) は、エピジェネティクスの解析手法のひとつとして、汎用的に用いられています。この手法により、遺伝子発現に関するタンパク質がゲノムDNA上のどの領域に特異的に結合しているか解析することが可能となります。哺乳類では、ChIPサンプルとして得られるプロモーター領域およびその近傍に、CpGアイランドと呼ばれる特にGC含量が高い領域が存在する場合があります。このようなサンプルでは、リアルタイムqPCRを用いたChIPサンプルの定量解析において、効果的なプライマー設計が難しく、ターゲット領域のqPCR検出に困難が生じる場合があります。

本稿では、ChIPサンプルにおける非常に高いGC含量 (76.8%) の領域をターゲットとした、難易度が高いqPCR条件の最適化の事例についてご紹介します。

下記のデータは、麻布大学大学院 獣医学研究科 分子生物学研究室 片川優子様、教授 村上賢様 のご厚意により掲載させて頂きました。

方法

● テンプレートDNA (ChIPサンプル) の調製方法

SimpleChIP® Plus Enzymatic Chromatin IPキット (#9005, Cell Signaling Technology, Inc.) を使用しC2C12細胞から調製した。回収した溶液のうち2μlをテンプレートとして使用した。

● qPCRターゲット領域 (アンプリコンの情報)

185bp (うちGC : 142bp、GC含量 : 76.8%)

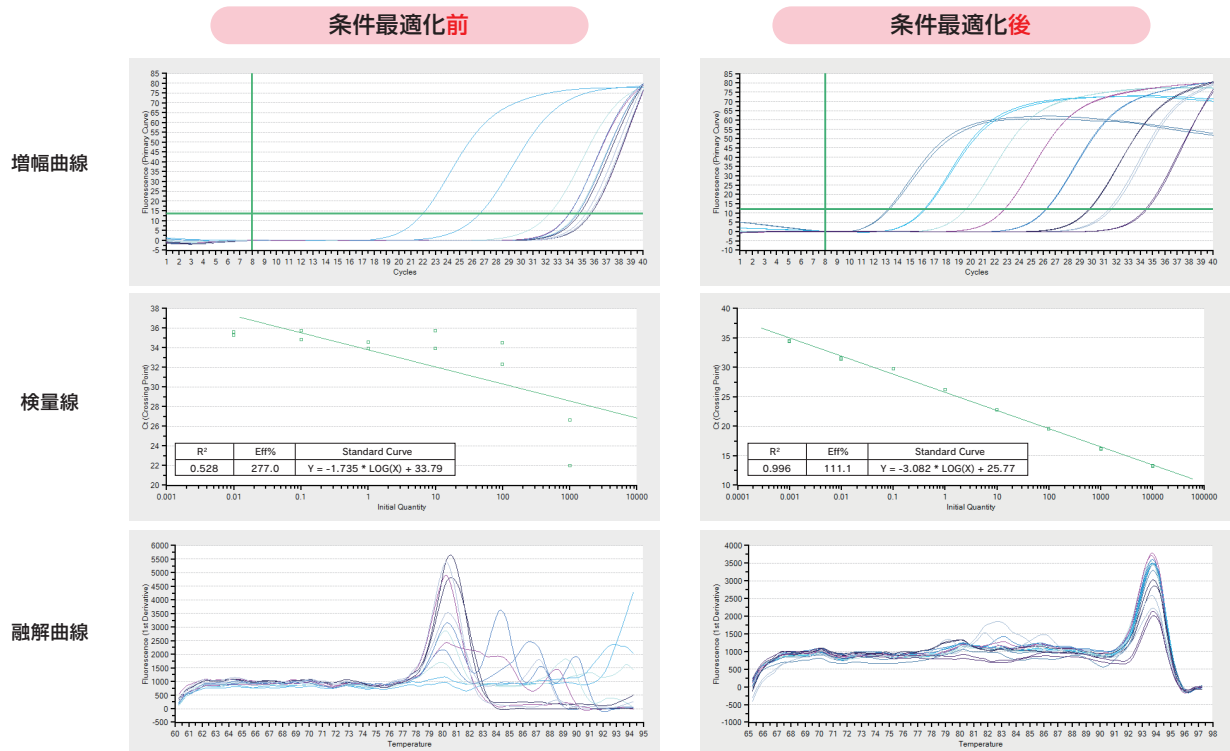
● qPCR試薬

KAPA SYBR Fast qPCR Kit (KK4601, KK4602, KAPA BIOSYSTEMS)

● qPCR装置

Takara Dice

高GC含量 (76.8%) ターゲット領域のqPCR条件最適化前後の結果比較



詳細は次ページより

最初の検討条件と結果

これまで実施してきたKAPA SYBR Fast qPCR kitのqPCRの反応条件を参考として、以下の条件で実施した。

● qPCR反応組成

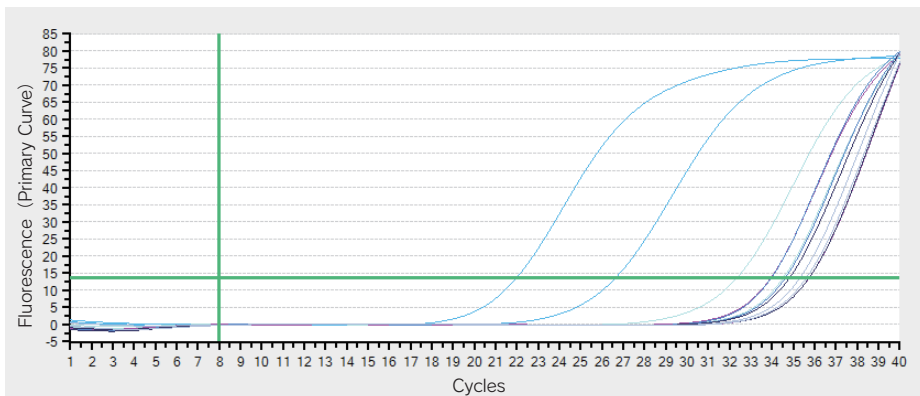
| | |
|-----------------------------|--------------|
| 2xqPCRMasterMix | 12.5 μ l |
| Forward Primer (10 μ M) | 0.5 μ l |
| Reverse Primer (10 μ M) | 0.5 μ l |
| Template DNA | 2 μ l |
| 滅菌蒸留水 | 9.5 μ l |
| (トータル反応量) | 25 μ l |

*使用したプライマーの精製グレード: OPC精製

● qPCRプログラム

| | | | |
|---------|-----------------|--------|-----------|
| 初期変性 | 95 $^{\circ}$ C | 30 sec |] ×40サイクル |
| 変性 | 95 $^{\circ}$ C | 5 sec | |
| アニール/伸長 | 60 $^{\circ}$ C | 30 sec | |

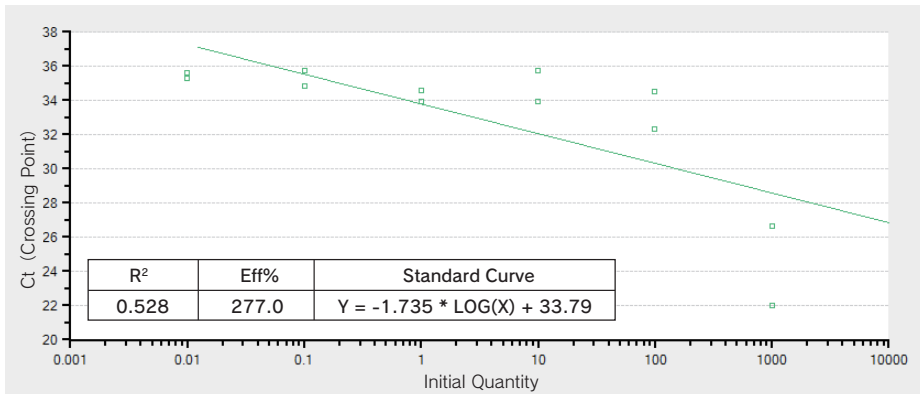
増幅曲線



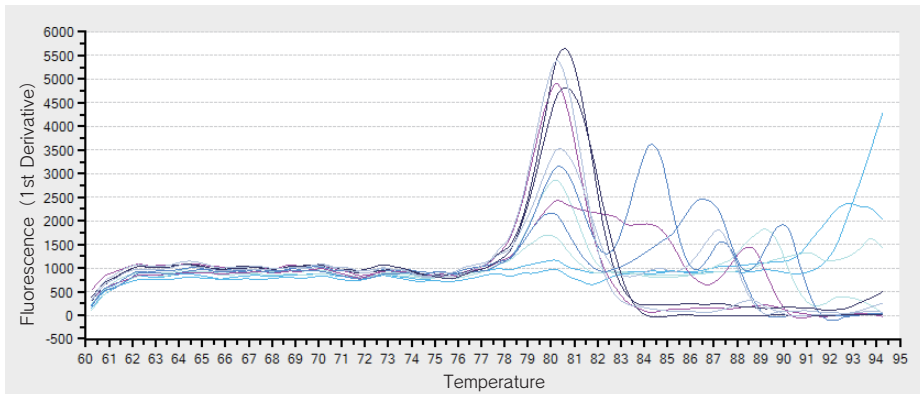
qPCRの結果、検量線において $R^2=0.528$ 、 $Eff\%=277.0\%$ と、信頼性の高い値が得られず、また、融解曲線から多くの非特異増幅の可能性が示唆された。

やはり、アンプリコンのGC含量が非常に高く(GC 76.8%)、難易度が高いことから、qPCR反応条件の最適化が必要と考えられた。

検量線



融解曲線



最適化の方法案

そこで、KAPA社からのサポート情報として、次のステップごとに最適化を検討することとした。

〈ステップ1〉

まずはKAPA SYBR Fast qPCRキットのバッファー条件における最適な「アニール/伸長」温度を確認する。

具体的には、反応組成は現状のまま、KAPA SYBR Fast qPCRキットの推奨条件に改変を加えた次のプログラムでグラジエントPCRを実施する。

| | | | |
|---------|---------|--------------------|-----------|
| 初期変性 | 95°C | 180 sec | |
| 変性 | 95°C | 3 sec |] ×40サイクル |
| アニール/伸長 | 58-65°C | 20 sec (グラジエントPCR) | |

- *GCリッチな領域のため、初期変性は180secに設定する。
- *グラジエントPCRでアニール/伸長の温度範囲を58-65°Cに設定する。
- *増幅後のチェックは電気泳動でも可能とする。

〈ステップ2〉

更に結果の改善が必要な場合、次に初期変性の温度を98°Cまで上げてqPCRを実施する。

| | | | |
|---------|----------|---------|-----------|
| 初期変性 | 98°C | 180 sec | |
| 変性 | 95°C | 3 sec |] ×40サイクル |
| アニール/伸長 | (最適温度)°C | 20 sec | |

〈ステップ3〉

ここまでで結果が改善されない場合、反応液にDMSOを終濃度0~5%で濃度を振って添加する。
(DMSOの代わりにBetaine 0M~1.5Mあるいはformamide 0%~5%も代用可能)

最適化の結果

〈ステップ1〉で、「アニール/伸長」温度 58°C、62°C、65°CでPCRを行ったところ、65°Cで明確なシングルバンドが得られた。(データ未掲載)
この時点で、同条件でqPCRを行ったところ、融解曲線にばらつきがみられ、信頼性のある検量線が得られなかった。(データ未掲載)

〈ステップ2〉において、初期変性、変性温度をともに98°Cに上げ、以下の条件でqPCRを実施したところ、明確な結果の改善が見られた。

● qPCR反応組成

| | |
|-----------------------|--------|
| 2xqPCRMasterMix | 12.5μl |
| Forward Primer (10μM) | 0.5μl |
| Reverse Primer (10μM) | 0.5μl |
| Template DNA | 2μl |
| 滅菌蒸留水 | 9.5μl |
| (トータル反応量) | 25μl) |

● qPCRプログラム

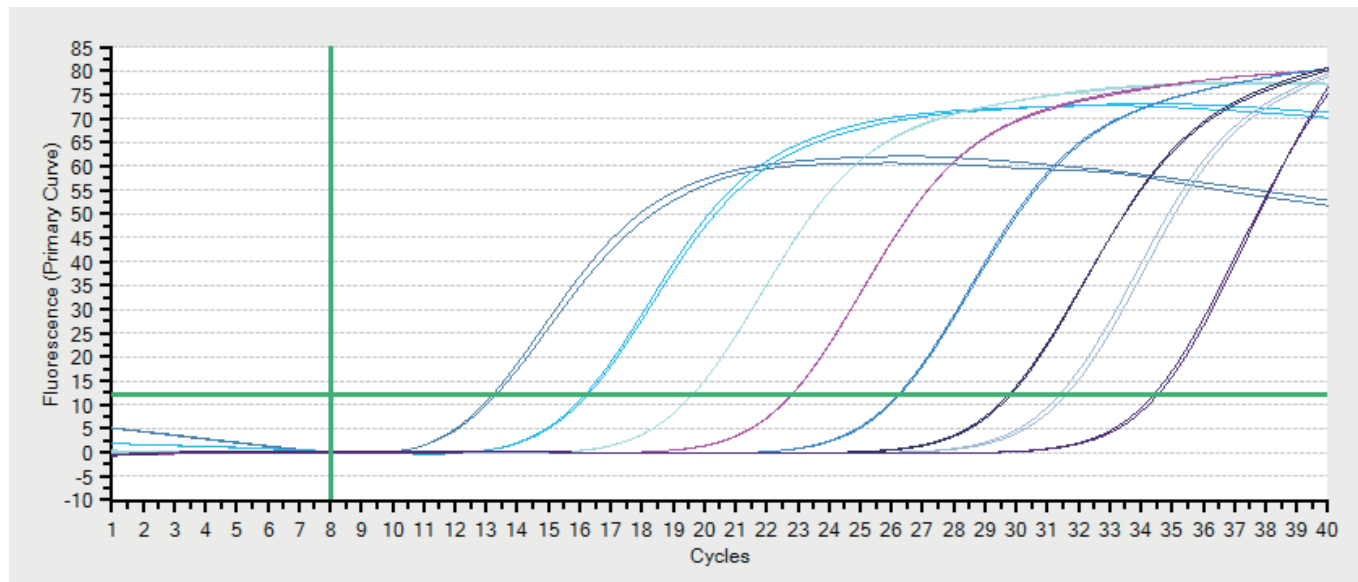
| | | | | |
|----------|---------|------|--------|-----------|
| (最適化前条件) | 初期変性 | 95°C | 30 sec | |
| | 変性 | 95°C | 5 sec |] ×40サイクル |
| | アニール/伸長 | 60°C | 30 sec | |



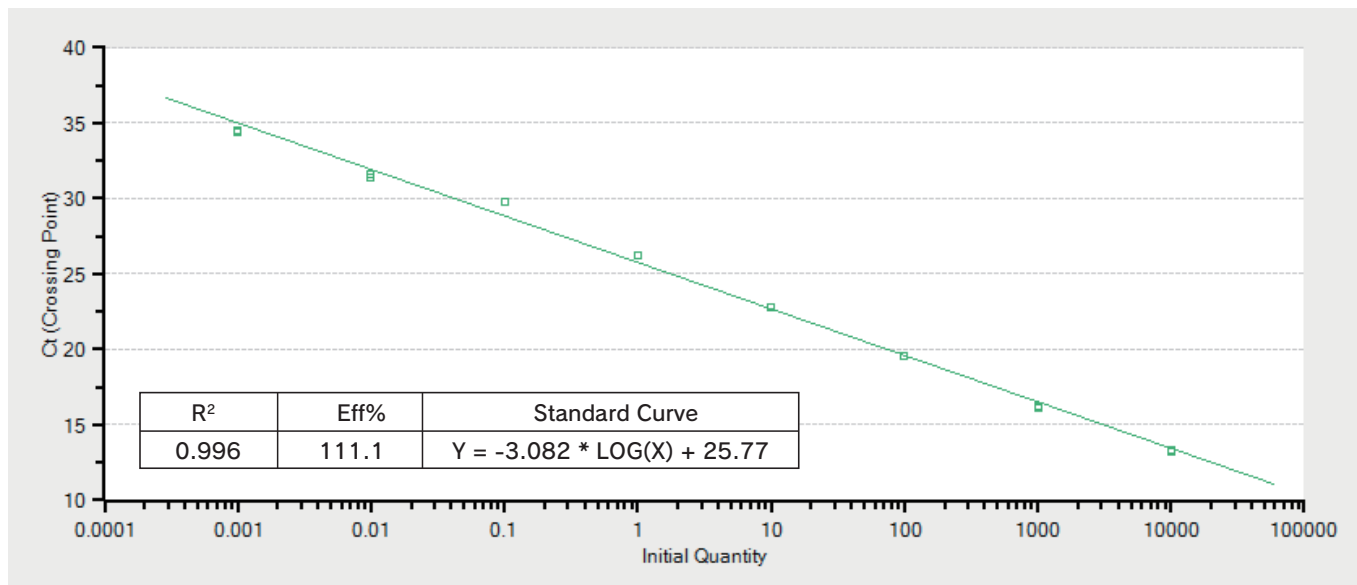
| | | | | |
|----------|---------|-------|---------|-----------|
| (最適化後条件) | 初期変性 | 98°C | 180 sec | |
| | 変性 | 98°C* | 3 sec |] ×40サイクル |
| | アニール/伸長 | 65°C | 20 sec | |

*サイクルの中の変性温度も98°Cに設定した

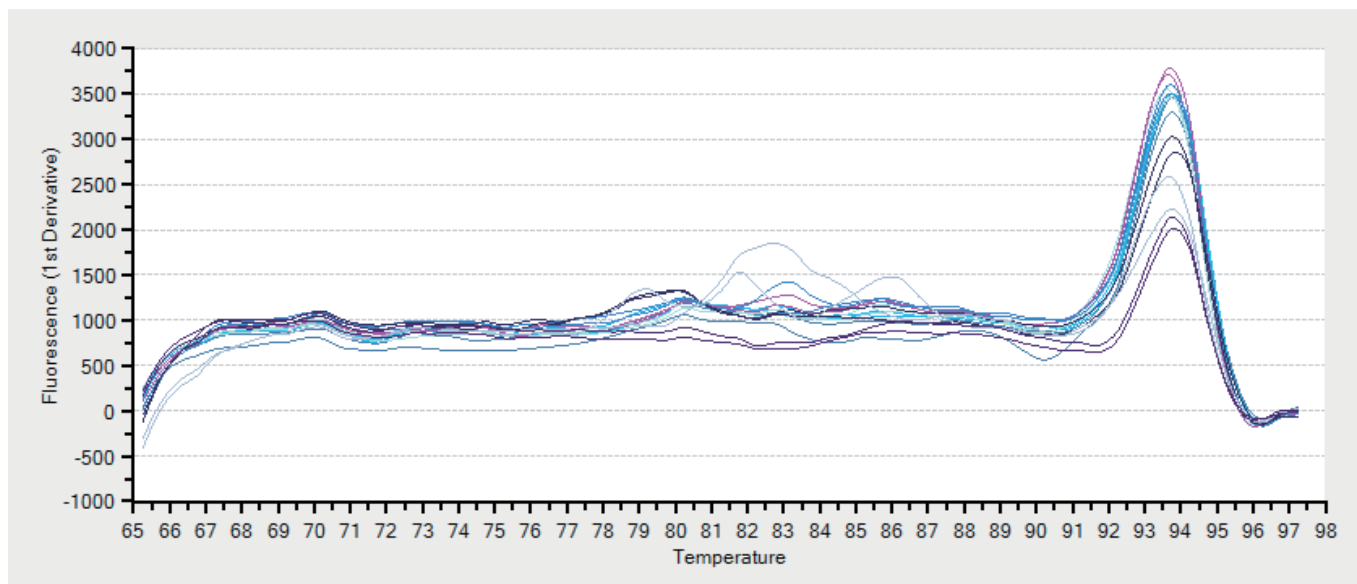
増幅曲線



検量線



融解曲線



最適化の結果、非特異増幅が大幅に抑制され、検量線も $R^2=0.996$ 、 $\text{Eff}\%=111.1\%$ に改善された。
結果として、ターゲット領域の定量が可能となった。



お客様のコメント

非常に丁寧なサポートをしていただいたおかげで、既存の製品のまま高GC含量のサンプルを増幅させることに成功し、実験を進めることができました。