

## Capillary Gel Electrophoresis for Ligase Detection Reaction Products

Masahiko HASHIMOTO\*, Jun KAMIGORI\*\* and Kazuhiko TSUKAGOSHI\*\*\*

(Received October 7, 2009)

One technique that can distinguish low-abundant mutant DNA from wild-type DNA is the ligase detection reaction (LDR) coupled to a primary polymerase chain reaction (PCR). The LDR products obtained by the PCR/LDR assay can be analyzed in a variety of fashions such as microarray and slab gel electrophoresis. In the present work, we applied capillary gel electrophoresis (CGE) with fluorescence detection (FL) (CGE-FL) for analyzing the LDR products. Polyethylene oxide (PEO) polymer solution containing SYBR Gold, which could bind to a single strand DNA, was used as a separation matrix in the CGE-FL system. The LDR products could successfully be separated from other DNA fragments such as LDR primers and template, enabling the determination of the single base substitutions on codon 12 of *K-ras* gene.

**Key words:** capillary gel electrophoresis, polymer solution, point mutation, ligase detection reaction

**キーワード:** キャピラリーゲル電気泳動, ポリマー溶液, 点突然変異, リガーゼ検出反応

### キャピラリーゲル電気泳動によるリガーゼ検出反応生成物の分析

橋本 雅彦, 上郡 純, 塚越 一彦

#### 1. はじめに

*ras* 遺伝子はそのままで発癌活性を持たないが、これらの遺伝子に変異が生じると発癌活性を有し、該変異を有する細胞が形質転換されることが知られている。*ras* 遺伝子群 (*H-ras*, *K-ras*, *N-ras*, *R-ras*) を構成する *K-ras* 遺伝子の活性化型変異体 (*K-ras* 癌遺伝子) は、ヒトの癌において最も多く見いだされる癌遺伝子の一つであり、これらの癌では、*K-ras* 癌遺伝子からの変異型 *K-ras* タンパク質の持続的な発現、生成が細胞の癌化および癌細胞としての形質維持に必要不可欠であることが明らかとなっている。例えば、*K-ras* 遺伝子のエクソン 1、

コドン 12 (GGT)における塩基は、GAT, GCT, GTT へと一塩基置換される場合があり、それぞれアミノ酸残基 Asp, Ala, Val へと翻訳される。これらのアミノ酸は、GTP 結合において重要な役割を果たしており、このコドンにおける点突然変異は、GTP の加水分解を抑制し、恒常的に活性シグナリング機能を有する癌遺伝子 p21 *ras* タンパク質を生成する。大腸癌においては、すべての大腸癌患者の約 30—50% において癌発達の初期段階に *K-ras* 遺伝子に点突然変異を持つことが知られている<sup>1)</sup>。それゆえ *K-ras* 遺伝子における突然変異の有無に関する情報を得ることは、癌疾病の管理に有用である。

\* Department of Chemical Engineering and Materials Science, Doshisha University, Kyoto  
Telephone:+81-774-65-6594, Fax:+81-774-65-6803, E-mail: mahashim@mail.doshisha.ac.jp

\*\* Former graduate student of Doshisha University

\*\*\* Department of Chemical Engineering and Materials Science, Doshisha University, Kyoto  
Telephone:+81-774-65-6595, Fax:+81-774-65-6803, E-mail: ktsukago@mail.doshisha.ac.jp

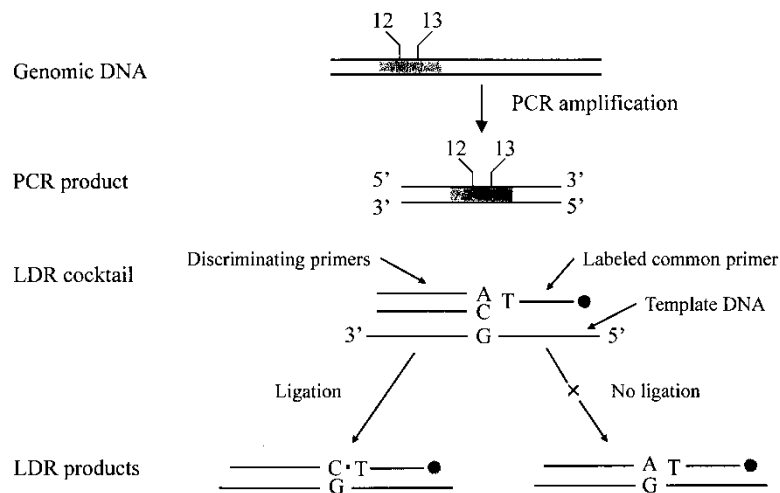


Fig. 1. Conceptual schematic of the PCR/LDR assay.

突然変異の検出において最大の障壁は、検出の対象となる変異 DNA コピーが、圧倒的多数を占める正常型 DNA コピー群の中に僅かしか存在していないことである。多くの癌において、主要な癌組織においてすら、正常細胞の含有率は 70%にもなる<sup>2)</sup>。それゆえ、腫瘍細胞の 2 倍体ゲノムの一方にのみ変異が存在するならば、変異 DNA の含有率は 15% ではない。この値は、サンプル採取が主要な癌組織から離れてしまった場合、著しく低下する。したがって、大多数の正常型細胞群に極少量含まれる変異細胞を正確かつ高感度に特定する技術の開発が必要である。

正常型 DNA の中から微量の変異 DNA を識別する手法の一つに、ポリメラーゼ連鎖反応/リガーゼ検出反応 (PCR/LDR) アッセイが知られている<sup>3-5)</sup>。PCR/LDR アッセイでは、反応終了後、反応生成物 (LDR 生成物) を未反応の反応物から分離し検出する必要がある。本研究では、PCR/LDR アッセイにおける分析効率の向上を目的とし、生体高分子に対し高速かつ高分離能を有するキャピラリーゲル電気泳動 (CGE) により LDR 生成物の分析を行った。

## 2. PCR/LDR アッセイの原理

PCR/LDR アッセイの概略図を Fig. 1 に示す。まず、PCR によりゲノム DNA の点突然変異を含む領域を PCR により増幅する。ここで得られた PCR

産物をテンプレート DNA として用い LDR 反応を行う。LDR では、3'末端にそれぞれ異なるヌクレオチド (A, G, T, C) を持つ 4 種の識別プライマー、5'末端がリン酸化され 3'末端が蛍光ラベル化された共通プライマーの 2 種の LDR プライマーおよび DNA リガーゼをテンプレート DNA に加える。この LDR 反応カクテルを加熱することによって 2 本鎖のテンプレート DNA を 1 本鎖 DNA に熱変性させ、その後 LDR プライマーの  $T_m$  値付近まで冷却し、LDR プライマーをテンプレート DNA の相補鎖にアニーリングさせる。識別プライマーの 3'末端の塩基が変異部位の塩基と相補的な場合にのみ、識別プライマーの 3'末端と共通プライマーの 5'末端は DNA リガーゼにより連結され、3'末端が蛍光ラベル化された一本のオリゴヌクレオチド (LDR 生成物) が得られる。LDR 反応は、耐熱性 DNA リガーゼを用いることにより、上記温度サイクルを繰り返すことが可能となり、LDR 生成物を増幅させることができる。

LDR 終了後、LDR 生成物の有無を確認するために、LDR 生成物を未反応の共通プライマーから分離し蛍光検出する必要がある。本研究では、LDR 終了後の反応溶液中の LDR 生成物を未反応の共通プライマーから CGE により分離し、オンラインで蛍光 (FL) 検出した。

Table 1. Sequences of oligonucleotide used in the PCR/LDR assays

Primer	Sequences (5' → 3')	Size (mer)
K- <i>ras</i> forward	TTAAAAGGTACTGGTGGAGTATTTGATA	28
K- <i>ras</i> reverse	AAAATGGTCAGAGAAACCTTTATCTGT	27
K- <i>ras</i> Com-2	pTGGCGTAGGCAAGAGTGCCT-Fluorescein	20
K- <i>ras</i> c12.2 WtG	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG	23
K- <i>ras</i> c12.2V	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGT	23
K- <i>ras</i> c12.2D	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGA	23
K- <i>ras</i> c12.2A	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGC	23

### 3. 試薬および実験方法

#### 3.1 試薬

本研究に用いた試薬は、全て市販の特級品を用いた。カルボキシメチルセルロース (CMC), グリシンは、和光純薬工業より購入した。トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (Tris), エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)は、ナカライテスクより購入した。10x Tris-ホウ酸-EDTA 緩衝溶液は、Bio-Rad Laboratories より購入した。Taq DNA ポリメラーゼ, dNTP mix および正常型 (wild-type) ヒトゲノム DNA (G12G; GGT) は、Promega より購入した。Taq DNA リガーゼは、New England BioLabs より購入した。SYBR Gold は、Invitrogen より、ポリエチレンオキシド (PEO;  $M_r$  8,000,000) およびポリビニルピロリドン (PVP;  $M_r$  130,000) は、Sigma-Aldrich より購入した。PCR および LDR に用いたオリゴ DNA (Table 1) の合成は、Invitrogen または Sigma Genosys に依頼した。

反応溶液の調製には、nuclease-free water (Promega)を用いた。CE 分析用の溶液の調製には、純水製造装置 (MILLIPORE, Elix 3 UV) で精製された RO 水を用いた。K-*ras* 遺伝子のエキソン 1, コドン 12.2 に変異 (G12V; GTT) を持つヒト大腸癌由来細胞株 (SW480) は、Gene Tex より購入し、Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega) を用いて精製した。

### 3.2 実験方法

#### 3.2.1 PCR

200  $\mu$ L の PCR チューブに、1.5 mM の  $MgCl_2$  を含む 1x PCR バッファを加え、その後 200  $\mu$ M dNTPs, 500 nM K-*ras* forward および reverse プライマー (Table 1), 4.2 ng/ $\mu$ L テンプレート DNA を順に加えた後、Master cycler (Eppendorf) に PCR チューブをセットした。95°C で 2 min 保った後、2.5 U DNA ポリメラーゼを加えた (反応液全量 50  $\mu$ L)。引き続き、95°C で 30 s, 60°C で 1 min, 72°C で 1 min 30 s 間保持し、このサイクルを 40 回行った。サイクル終了後、完全な 2 本鎖 DNA を得るために 72°C で 3 min

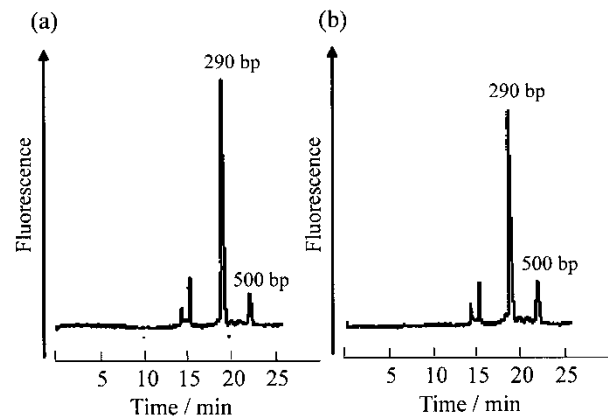


Fig. 2. Size confirmation for the PCR products derived from (a) wild-type and (b) mutant (SW480).

500 bp PCR product was used as a size standard. Conditions: gel matrix, 0.5%(w/v) PEO in 1xTBE buffer containing 1x SYBR Gold; applied voltage, 12 kV.

反応させた。得られた PCR プロダクトのサイズ (290 bp) は、PEO を分離マトリックスに用いた CGE により確認した (Fig. 2)。

### 3.2.2 LDR

200  $\mu$ l のマイクロチューブに、20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 25 mM 酢酸カリウム, 10 mM 酢酸マグネシウム, 10 mM DTT, 1 mM NAD<sup>+</sup> および 0.1 % Triton X-100 を含む LDR Reaction buffer, 30 nM 識別プライマー, 30 nM フルオロセイン標識共通プライマー (Table 1), PCR プロダクトおよび 2 U *Taq* DNA Ligase を混合した (全量 50  $\mu$ l)。Master cycler を用いて反応溶液を 94°C で 2 min 加熱した後、94°C で 30 s, その後 65°C で 2 min 保持する温度サイクルを 40 回繰り返した。

本研究における LDR では、4 種の異なる塩基を 3' 末端に持つ識別プライマーをそれぞれ加えた 4 つの反応溶液を調製した。その中で、テンプレート DNA (G12V) の変異した塩基に対し相補的な塩基を 3' 末端に持つ識別プライマー (*K-ras* c12.2V in Table 1) を加えた反応溶液においてのみ、蛍光ラベル化された 43-mer の LDR 生成物が得られ、点突然変異が検出される。

### 3.2.3 分離マトリックス

本研究では、1x TBE 緩衝液 (89 mM Tris-ホウ酸 -2 mM EDTA (pH 8.3)) で調製した 0.5 % (w/v) の PEO ポリマー溶液および 25 mM TGE 緩衝液 (25 mM Tris-グリシン-5 mM EDTA (pH 8.3)) で調製した 0.3 % (w/v) CMC ポリマー溶液を分離マトリックスとして用い CGE 分析を行った。ポリマー溶液調製時には、あらかじめスターラーで緩衝溶液を 900 rpm で攪拌している状態で、秤量したポリマーをその中心へ滞りなく加えることで、できる限り均一に溶解させた。また、60 min 攪拌した後、15 min 超音波槽に入れポリマーを完全に溶解した。

### 3.2.4 GE-FL 分析

本研究に用いた CE システムは、フューズドシリカキャピラリーチューブ (GL Sciences), 高圧電源 (Model HZCE-30PNO.25, Matsuda Precision Devices

Co.), FL 検出器 (RF-550, Shimadzu), インテグレーター (CR-6A, Shimadzu) で構成されている。キャピラリーチューブ外壁のポリイミド被覆を Window Maker<sup>TM</sup> (Micro Solv) を用いて長さ 2 mm 焼除き検出窓とし、励起光が検出窓を照射するようにキャピラリーチューブを設置した。キャピラリーチューブは、前処理として 1 M NaOH 水溶液で 10 min, 0.2 M NaOH 水溶液で 5 min, さらに RO 水で 2 min 洗浄した。また、電気浸透流を小さくしたい場合には、使用前に 2.0 % (w/v) PVP ポリマー溶液をキャピラリー内に通した。前述した PEO あるいは CMC ポリマー溶液を充填し、高圧電源を用いてキャピラリーチューブ (内径 75  $\mu$ m, 外径 150  $\mu$ m, 70 cm (実効長 50 cm)) の両端に高電圧を印加し、被検体を泳動させ FL 検出器を用いて検出した。また、FL 検出器の励起および検出波長を、被検体の最大励起波長および最大蛍光波長に合わせて実験を行った。

## 4. 結果および考察

### 4.1 CMC ポリマー溶液を用いた GE-FL 分析

本研究に用いたヒト大腸癌細胞由来株 SW480 (G12V) は *K-ras* 遺伝子のエキソン 1, コドン 12.2 において、塩基が C から A に変異している<sup>6)</sup>。よって 4 種の識別プライマー (*K-ras* c12.2WtG, c12.2V, c12.2D, c12.2A) (Table 1) の中で *K-ras* c12.2V を用いて LDR を行った場合にのみ LDR 生成物が得られることが予想される。

LDR 後に得られた 4 つの LDR 反応溶液を FL 検出による CMC ポリマー泳動液を用いた CGE によってそれぞれ分析した。反応後の溶液に LDR 生成物が生成していれば、その生成物のピークおよび残渣の蛍光標識共通プライマーのピークが得られると考えられる。しかし、Fig. 3(a) に示すように 4 つの反応液ともにフルオロセイン標識共通プライマーによる非常に小さな蛍光シグナルのみが検出され、目的の LDR 生成物のピークを検出することはできなかった。これは、本分析システムが、微量

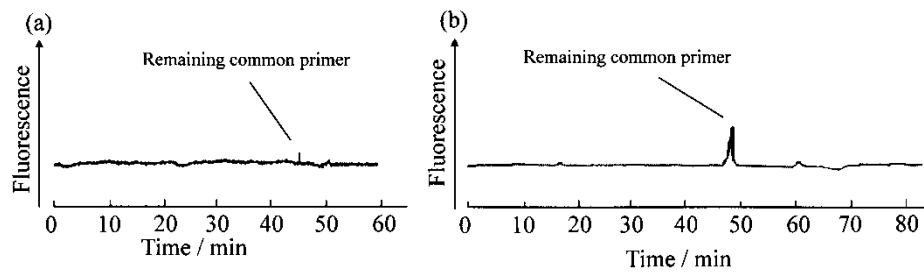


Fig. 3. Electropherograms of the LDR products without (a) and with 20-fold preconcentration (b).

Conditions: gel matrix, 0.3%(w/v) CMC in 25 mM TGE buffer; applied voltage, 12 kV.

の LDR 反応生成物を検出するのに十分な検出感度に至っていないためであると考えられる。FL 検出によるフルオレセイン標識共通プライマーの検出限界 ( $2 \times 10^{-7}$  M) から、LDR の反応収率は 30 % 以下であることが推測される。

次に、LDR 後の反応溶液を濃縮して分析を行った。濃縮の際には 4 回分の LDR 反応溶液 (各 50  $\mu$ L) を 1 つのチューブに加え (全量 200  $\mu$ L)、これを減圧下で乾燥させ再び溶媒を 10  $\mu$ l 加えることで 20 倍に濃縮した。同様に、CMC ポリマーを分離マトリックスに用いた CGE-FL 検出によってこの濃縮した反応溶液を分析した。このとき、Fig. 3 (b) に示すように、濃縮前と同様にフルオレセイン標識共通プライマーに基づくピークのみが得られ、LDR 生成物を検出するまでに検出感度を改善することはできなかった。レーザー光源を用いた LDR 生成物の検出が報告されているが<sup>7,8)</sup>、アーク光源を用いた場合は、共通プライマーにタグされた蛍光に基づく検出は感度の点で困難であると考えられる。

#### 4.2 PEO ポリマー溶液を用いた CE-FL 分析

インターカレーターは 2 本鎖 DNA のらせん構造にインターカレートし、DNA の相補的塩基対の中に入り込むことで強い蛍光を示す物質である。インターカレーターの一種である SYBR Gold は、2 本鎖だけでなく 1 本鎖の DNA とも結合することが知られており、近年、SYBR Gold および尿素を泳動液に加えた CGE において、1 本鎖 DNA の定量を行

った例が報告されている<sup>9)</sup>。

共通プライマーの 3'末端に標識された蛍光に基づく検出が困難であった前述の結果を受け、SYBR Gold を泳動液に加えた LDR 生成物の検出について検討した。SYBR Gold を本システムに適用する場合、SYBR Gold によって染色させることが可能な LDR 生成物と反応液に含まれるその他の DNA フラグメント (テンプレート DNA, 識別プライマー, 共通プライマー) を分離する必要がある。この分離を達成できれば、LDR 生成物の選択的検出が可能となり、その変異の種類を特定できる。

LDR 後の反応溶液を 20 倍濃縮し、SYBR Gold を溶解させた PEO ポリマー泳動液をキャピラリーに充填し CGE 分析を行った。反応溶液に K-ras c12.2 WtG, c12.2V, c12.2D および c12.2A プライマーをそれぞれ加えて LDR 反応を行い、これらを CGE-FL システムで分析した結果を Fig. 4 (a)–(d) に示す。Fig. 4 (a), (c) および (d) において、同様の 3 本のピークが見られた。これらは識別プライマー、共通プライマーおよびテンプレート DNA によるピークであると考えられる。この分離系においては、サイズが小さなものほど溶出時間が早いため、約 11 min 付近に見られる 2 本のピークがそれぞれ識別プライマーおよび共通プライマーに基づき、約 13 min 付近に見られるピークがテンプレートによるものであると考えられる。共通プライマー (20-mer) より僅かにサイズの大きい識別プライマー (23-mer) が先に検出されたのは、共通プライマ

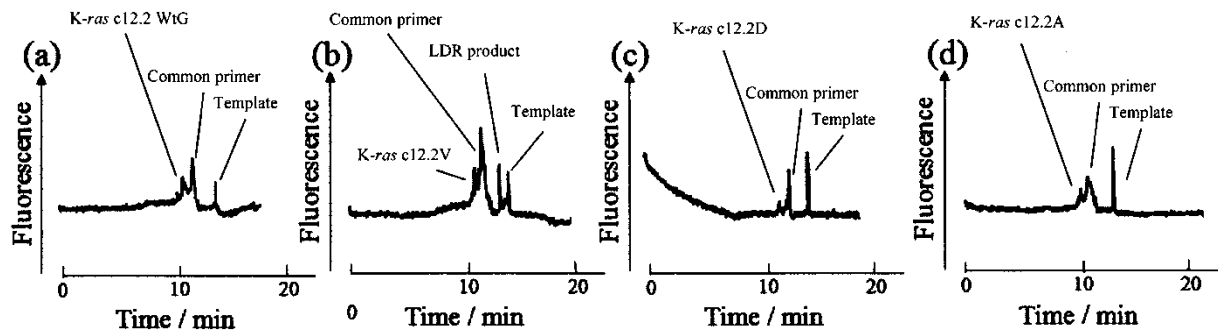


Fig. 4. Electropherograms of the LDR products obtained using the different discriminating primers of (a) K-ras c12.2WtG, (b) K-ras c12.2V, (c) K-ras c12.2D and (d) K-ras c12.2A.

Conditions: gel matrix, 0.5%(w/v) PEO in 1xTBE buffer containing 1x SYBR Gold; applied voltage, 12 kV.

ーにタグされている蛍光色素フルオレセインの影響であると考えられる。Fig. 4(b) においては、Fig. 4(a), (c), (d)では観られない特異的なピークが検出され、そのサイズより判断すると、LDR 生成物のピークであると考えられる。このとき用いた識別プライマーは K-ras c12.2V プライマーであることから、G → T の DNA 点突然変異を検出することができた。これらのことより、インターカレーターとして SYBR Gold を用いた CGE によって LDR 生成物を分析することで DNA 点突然変異の特定が可能であると考えられる。

## 5. 結論

本研究では、PCR/LDR アッセイにおける最終プロダクトである LDR 生成物を CGE により分離し、レーザー光源より安価なアーク光源を用い蛍光検出を試みた。本実験系における LDR の反応率は 30 %以下であり、微量の LDR 生成物を検出するには、共通プライマーにタグされた色素の蛍光に基づく検出法では検出感度が不十分であった。

インターカレーターである SYBR Gold を分離ポリマー溶液に添加した LDR 生成物の CGE 分析法について検討し、細胞系 SW480 (G12V) の K-ras 遺伝子、エクソン 1、コドン 12.2 において塩基が C から A へ変異していることが確認でき、PCR/LDR アッセイに SYBR Gold を分離マトリックスに添加し

た CGE-FL 検出法が DNA 点突然変異の特定に有用であることを見出した。

本研究の一部は、「理工学研究所 2008 年度同志社大学理工学研究所研究助成金（個人）」の支援を受けた。ここに記して、謝意を表す。

## 参考文献

- 1) M. Hashimoto, F. Barany and S. A. Soper, "Polymerase chain reaction/ligase detection reaction/hybridization assays using flow-through microfluidic devices for the detection of low-abundant DNA point mutations", *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1915-1923 (2006).
- 2) N. P. Gerry, N. E. Witowski, J. Day, R. P. Hammer, G. Barany and F. Barany, "Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations", *J. Mol. Bio.*, **292**, 251-262 (1999).
- 3) M. Khanna, P. Park, M. Zirvi, W. Cao, A. Picon, J. Day, P. Paty and F. Barany, "Multiplex PCR/LDR for detection of K-ras mutations in primary colon tumors", *Oncogene*, **18**, 27-38 (1999).
- 4) K. Li, B. Chen, Y. Zhou, R. Huang, Y. Liang, Q. Wang, Z. Xiao and J. Xiao, "Multiplex quantification of 16S rDNA of predominant bacteria group within human fecal samples by polymerase chain reaction-ligase detection reaction (PCR-LDR)", *J Microbiol Methods.*, **76**, 289-294 (2009).
- 5) D. K. Toubanaki, T. K. Christopoulos, P. C. Ioannou and C. S. Flordellis, "Identification of single-nucleotide polymorphisms by the oligonucleotide ligation reaction:

- a DNA biosensor for simultaneous visual detection of both alleles”, *Anal. Chem.*, **81**, 218-224 (2009).
- 6) M. Hashimoto, M. L. Hupert, M. C. Murphy and S. A. Soper, “Ligase detection reaction/hybridization assays using three-dimensional microfluidic networks for the detection of low-abundant DNA point mutations”, *Anal. Chem.*, **77**, 3243-3255 (2005).
  - 7) R. Sinville, J. Coyne, R. J. Meagher, Y.-W. Cheng, F. Barany, A. Barron and S. A. Soper, “Ligase detection reaction for the analysis of point mutations using free-solution conjugate electrophoresis in a polymer microfluidic device”, *Electrophoresis*, **29**, 4751-4760 (2008).
  - 8) P. Yi, Z. Chen, Y. Zhao, J. Guo, H. Hu, Y. Zhou L. Yu and L. Li, “PCR/LDR/capillary electrophoresis for detection of single-nucleotide differences between fetal and maternal DNA in maternal plasma”, *Prenat. Diagn.*, **29**, 217-22 (2009).
  - 9) R. Oba, Y. Kudo, N. Sato, R. Noda and Y. Otsuka, “A new method of competitive reverse transcription polymerase chain reaction with SYBR Gold staining for quantitative analysis of mRNA”, *Electrophoresis*, **27**, 2865-2868 (2008).