

広範囲のバイサルファイトシーケンスによるDNAメチル化解析

No.CEM_009

カテゴリ: エピジェネティクス
 キーワード: DNAメチル化、バイサルファイト処理、バイサルファイトシーケンス、長鎖DNA増幅、効率化
 データソース: タカラバイオ株式会社

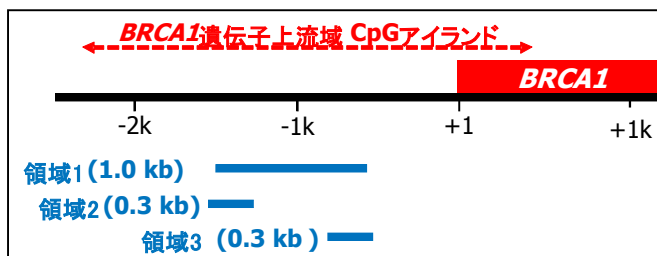
方法:

バイサルファイト処理DNAを鋳型としてPCRにより1 kbの長鎖領域を増幅することで、バイサルファイトシーケンスによるDNAメチル化解析を効率良く行った。

ヒト由来株化細胞 HEK293よりNucleoSpin® Tissue (製品コード [740952.10](#)) を用いてゲノムDNAを調製後、MethylEasy™ Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit (製品コード [ME002](#)) を用いてバイサルファイト処理を行った。

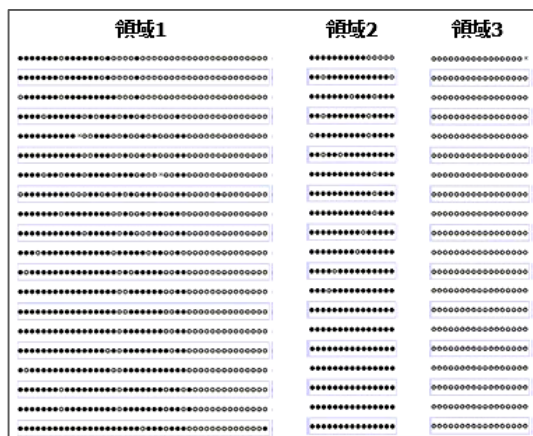
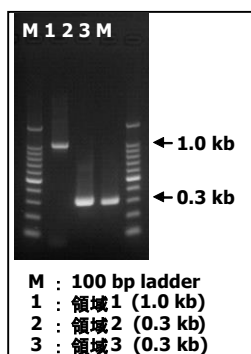
つづいて、得られたバイサルファイト処理DNAを鋳型に、Takara EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA) (製品コード [R110A](#)) を用いてBRCA1遺伝子上流領域を増幅後、得られたDNA増幅産物をMighty TA-cloning Kit (製品コード [6028](#)) を用いてpMD20T-Vectorにクローニングし、シーケンス解析した。バイサルファイト処理DNAからのBRCA1遺伝子上流領域の増幅には、右図に示す、領域1(1 kb)、領域2(300 bp)、領域3(300 bp)の増幅産物が得られるよう設計したプライマーを用いた。

PCR条件: 98°C 10 sec
 55°C 30 sec
 72°C 1 min } 40 cycles



結果:

バイサルファイト処理DNAからEpiTaq™ HSを用いたPCR増幅の結果、1 kbの増幅産物を対象とした領域1を含む全ての領域で目的の増幅産物が得られた(下図 左)。また、得られたDNA増幅産物をシーケンス解析した結果、何れの領域からも良好なメチル化解析結果が得られた(下図 右)。これまでのPCR酵素はバイサルファイト処理DNAでの長鎖増幅が困難であったが、Takara EpiTaq™ HSでは1 kbを超える増幅が可能で、領域2および3(各0.3 kb)をカバーする領域1(1 kb)も増幅でき、一度にプロモーター領域を広範囲にわたってシーケンスできるため、効率よくメチル化解析が可能である。



参考製品リンク:

[Takara EpiTaq™ HS \(for bisulfite-treated DNA\) \(製品コード R110A/B\)](#)

<http://catalog.takara-bio.co.jp/product/list.asp?catcd=B1000680&subcatcd=B1000683#B1000683>

[NucleoSpin® Tissue \(製品コード 740952.10\)](#)