

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

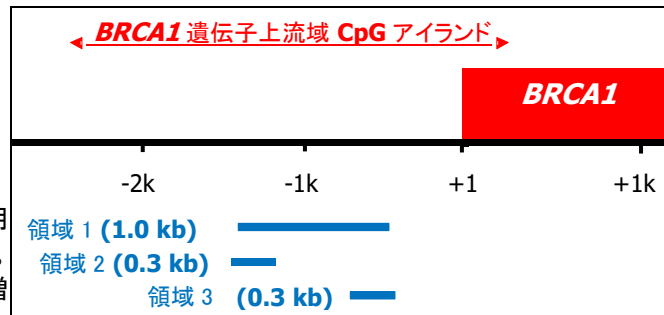
方法:

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 (終売) を用いてバイサルファイト処理を行った。

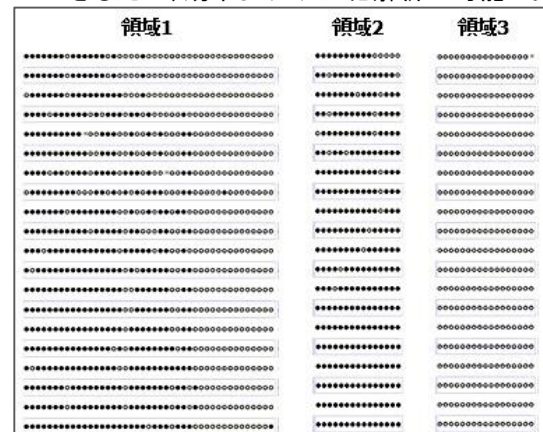
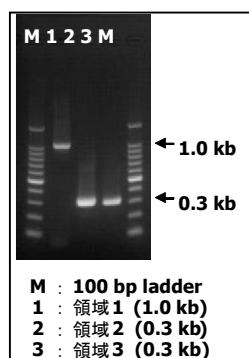
つづいて、得られたバイサルファイト処理 DNA を鋳型に、TaKaRa EpiTaq™ HS (for bisulfite-treated DNA) (製品コード [R110A](#)) を用いて *BRCA1* 遺伝子上流領域を増幅後、得られた DNA 増幅産物を Mighty TA-cloning Kit (製品コード [6028](#)) を用いて pMD20T-Vector にクローニングし、シーケンス解析した。バイサルファイト処理 DNA から *BRCA1* 遺伝子上流領域の増幅には、右図に示す、領域 1 (1 kb)、領域 2 (300 bp)、領域 3 (300 bp) の増幅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

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

[関連製品一覧](#)