

I. DNA メチル化解析

DNA メチル化解析法は、(A) メチル化 DNA を濃縮する方法、(B) バイサルファイト処理による塩基置換を利用する方法、(C) メチル化感受性の制限酵素を利用する方法の 3 種類に分類されます。新規ターゲットのスクリーニングには(A)の方法が、個別ターゲットの詳細な解析には(B)や(C)の方法がよく用いられています。

A. メチル化 DNA の濃縮

- ◆ゲノムワイドに DNA メチル化領域を濃縮
- ◆新規ターゲットのスクリーニングに

【1】原理

[EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit](#) では、メチル化 CpG に結合するタンパク質 (MBD2) を利用して DNA メチル化領域を濃縮します。まず、試料からゲノム DNA を抽出し、適当なサイズ*に断片化します。次に、予め磁性ビーズに結合させた MBD2 とゲノム DNA を混合し、メチル化 DNA を結合させます。その後、塩によりメチル化 DNA を溶出しますが、塩濃度の調整により、CpG メチル化頻度に応じメチル化 DNA を分画することも可能です。

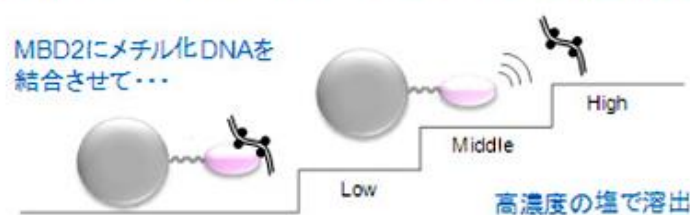
* その後の解析手法により、最適な断片化サイズは異なります。リアルタイム PCR には 200~800 bp 程度、マイクロアレイには 200 ~600 bp 程度、高速シーケンス解析には 200 bp 前後が最適です。

【Step1】ゲノムDNAの抽出 & 断片化



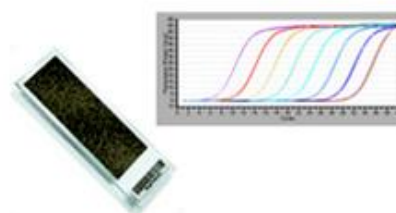
【Step2】DNAメチル化領域の濃縮

EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit



【Step3】濃縮産物の解析

- リアルタイムPCR
 - ・TB Green® Premix Ex Taq™ GC
- マイクロアレイ
- 高速シーケンス
 - ・受託サービス



【2】プロトコール

以下は、大まかな実験の流れです。操作方法の詳細は、該当製品の取扱説明書などをご参照ください。

(1) ゲノム DNA の抽出

[NucleoSpin® Tissue](#) によりゲノム DNA を抽出する（「4. 各解析に共通の試薬・キット」参照）。ゲノム DNA の必要量は、メチル化 DNA 濃縮後の解析手法によって異なるが、EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit による 1 回の濃縮には、約 1 μ g のゲノム DNA を使用する。

(2) ゲノム DNA の断片化

- 1) ゲノム DNA (2~10 μ g 程度) を TE 300 μ l に溶解する
- 2) 超音波破砕機を用いて適当なサイズ (200~800 bp) に断片化する
 - ✓ 超音波破砕の条件は、予備実験により決めておく。
 - ✓ 超音波破砕は、温度上昇を防ぐため、チューブを氷上に立てて行う。
- 3) アガロース電気泳動により断片化した DNA のサイズを確認する
- 4) 断片化 DNA をエタノール沈殿により濃縮し、滅菌水に溶解する
 - ✓ DNA の濃度を測定し、必要に応じて適当な濃度に調整する。

(3) EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit によるメチル化 DNA の濃縮

(操作方法の詳細は、本キットのユーザーマニュアルをご参照ください。)

1) ビーズの洗浄

TALON®磁性ビーズを分注し、1×Binding/Washing Buffer で 2 回洗浄後、1×Binding/Washing Buffer に懸濁する

2) MBD2 と TALON®磁性ビーズの結合

1. 洗浄済みビーズに MBD2 タンパク質を添加する
2. 室温で 1 時間、ローテーターで混合する
3. ビーズを 1×Binding/Washing Buffer で 3 回洗浄後、1×Binding/Washing Buffer に懸濁する

3) メチル化 DNA と MBD2 の結合

1. MBD2 を結合させたビーズに断片化した DNA を添加する
2. 室温で 1 時間、ローテーターで混合する
3. 上清を新しいチューブに回収する (非結合画分)
4. ビーズを 1×Binding/Washing Buffer で 2 回洗浄する

4) メチル化 DNA の溶出

1. ビーズを Elution Buffer に懸濁する
 2. 上清を新しい 1.5 ml チューブに回収する (溶出画分)
 3. 1~2 のステップを 1 回繰り返す
- ✓ 塩濃度の異なる 3 種類の Elution Buffer (Low, Middle, High) を順に使用すると、CpG メチル化頻度に応じメチル化 DNA を分画できる。分画の必要がない場合は、Elution Buffer (High) だけを使用する。

5) エタノール沈殿

1. 各回収画分に Gen とるくん™エタ沈キャリアを添加して、エタノール沈殿を行う
2. 70%エタノールでリンスする
3. 沈殿を乾燥させ、適当量 (20~40 μ l) の TE に溶解する

【3】 実験例

HeLa S3 細胞、A549 細胞 各 2×10^6 個からゲノム DNA を抽出し、得られたゲノム DNA の内、 $12 \mu\text{g}$ を超音波破砕機 (Covaris) で断片化した。次に、EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit によりメチル化 DNA の濃縮を行い、約 90 ng の DNA が得られた。その一部を鋳型とし、3 種類の遺伝子の転写開始点上流付近を対象として、リアルタイム PCR を行った。

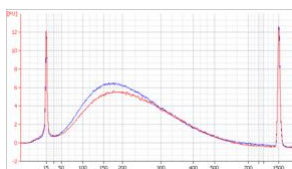


図 1. 断片化ゲノム DNA を Agilent 2100 Bioanalyzer で解析した結果
主に 100~300 bp のサイズに断片化されていた。

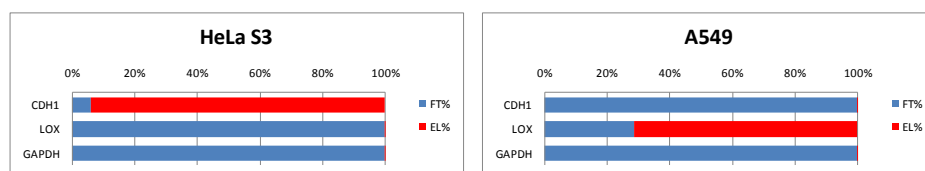


図 2. EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit による濃縮物をリアルタイム PCR で解析した結果
非結合画分、溶出画分の DNA をリアルタイム PCR で解析し、各画分の定量値をパーセンテージで表した (青：非結合画分、赤：溶出画分)。各細胞で異なる領域の DNA 濃縮が確認され、これらの遺伝子領域の DNA メチル化状態に違いがあることが示唆された。

【4】 製品リスト

[NucleoSpin® Tissue \(製品コード 740952.10/.50/.250\)](#)

[EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit \(製品コード 631963、631962\)](#)

濃縮産物の解析

a. リアルタイム PCR

- ◆濃縮メチル化 DNA や ChIP 後の特定領域の解析に
- ◆GC 含量の高い配列には専用のリアルタイム PCR 試薬を

【1】原理

EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit やクロマチン免疫沈降で目的の DNA 画分を濃縮した後、特定の遺伝子領域の定量をするにはリアルタイム PCR が用いられます。解析結果は、濃縮前 (Input) の量に対する濃縮後のパーセンテージ、または非結合画分と結合画分の割合等で表わされます。

・GC リッチターゲットに適したリアルタイム PCR 試薬

エピジェネティクスの解析では、多くの場合、転写開始点上流域が対象となりますが、この領域には CpG アイランドが存在し、配列の GC 含量が非常に高いことがあります。そのような配列には、GC 含量 60~70%でも精度の高い定量が可能な [TB Green® Premix Ex Taq™ GC \(Perfect Real Time\)](#)がお勧めです。また、GC 含量が 70%を超える場合には、[MightyAmp™ for Real Time \(TB Green® Plus\)](#)をお試しくささい。

【2】プロトコール

(操作方法の詳細は、各製品の説明書をご参照ください。)

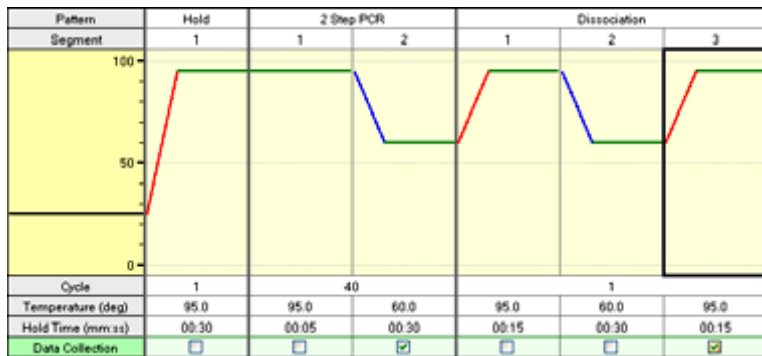
(1) 以下の反応液を調製する

試薬	使用量	最終濃度
TB Green® Premix Ex Taq™ GC (2×)	12.5 μl	1×
PCR Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM *1
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	0.2 μM *1
Template DNA	2.0 μl	*2
滅菌精製水	9.5 μl	*2
Total	25.0 μl	

*1 最終 primer 濃度は 0.2 μM で良い結果が得られる場合が多いが、反応性に問題がある時は 0.1~1.0 μM の範囲で最適な濃度を検討すると良い。

*2 DNA 濃度によって適宜調整可能。濃縮前のゲノム DNA 相当量で、20~100 ng 程度を用いると良い。

(2) 以下のプログラムでリアルタイム PCR を行う



Hold (初期変性)
 Cycle : 1
 95°C 30 秒

2 Step PCR
 Cycle : 40
 95°C 5 秒
 60°C 30 秒

Dissociation

【3】 実験例

HeLa S3 細胞、A549 細胞から抽出したゲノム DNA を断片化し、各 1.5 μ g を EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit による DNA メチル化領域の濃縮に用い、最終的にそれぞれ 45 μ l の非結合画分 (FT) および結合画分 (EL) の濃縮物を得た。1 反応あたり 1 μ l の濃縮物を鋳型としてリアルタイム PCR を行った。解析には各遺伝子の promoter 領域のプライマーと、TB Green® *Premix Ex Taq*™ GC (Perfect Real Time) を用いた。



図 3. ヒトの各遺伝子のメチル化解析の結果

EpiXplore™ の非結合画分および結合画分の DNA をリアルタイム PCR で解析し、各画分の定量値をパーセンテージで表した (青 : 非結合画分、赤 : 結合画分)。いくつかの遺伝子において、細胞の種類により濃縮度合いが大きく異なることが確認され、これらの遺伝子の転写開始点上流付近の DNA メチル化状態に違いがあることが示唆された。なお、A549 の CDKN2A と CDKN2B は、非結合画分、結合画分ともに検出されなかった。

【4】 製品リスト

[NucleoSpin® Tissue \(製品コード 740952.10/.50/.250\)](#)

[EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit \(製品コード 631963、631962\)](#)

[TB Green® *Premix Ex Taq*™ GC \(Perfect Real Time\) \(製品コード RR071A/B\)](#)

[MightyAmp™ for Real Time \(TB Green® Plus\) \(製品コード R075A/B\)](#)

b. マイクロアレイ解析

◆濃縮メチル化 DNA や ChIP 後のゲノムワイドな解析に

【1】原理

EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit やクロマチン免疫沈降で目的の DNA 画分を濃縮した後、マイクロアレイによりゲノムワイドな解析を行います。解析結果は、濃縮前 (Input) の DNA 量に対する濃縮後の DNA 量の比率として表されます。

【Step1】

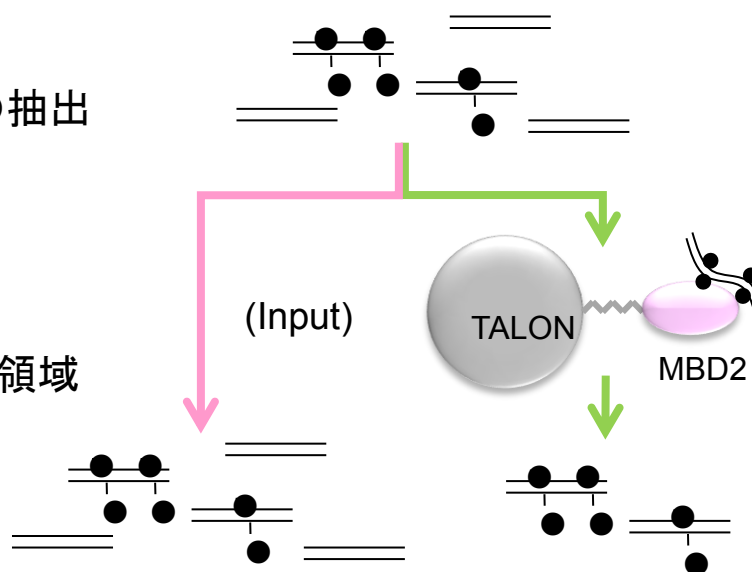
ゲノム DNA の抽出
& 断片化

【Step2】

DNA メチル化領域
の濃縮

【Step3】

マイクロアレイ解析



【2】実験例

HeLa S3 細胞、A549 細胞から抽出したゲノム DNA を断片化し、各 12 μ g を EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit による DNA メチル化領域の濃縮に用い、最終的に約 90 ng の濃縮物を得た。その内、70 ng を用いて whole genome amplification を行い、定法に従いラベリングした。また、コントロールとして EpiXplore™ による濃縮前の断片化ゲノム 70 ng を同様の手法にてラベリングした。濃縮前/後のラベリングした DNA を Agilent Human CpG Island Microarray 上で競合ハイブリさせた。

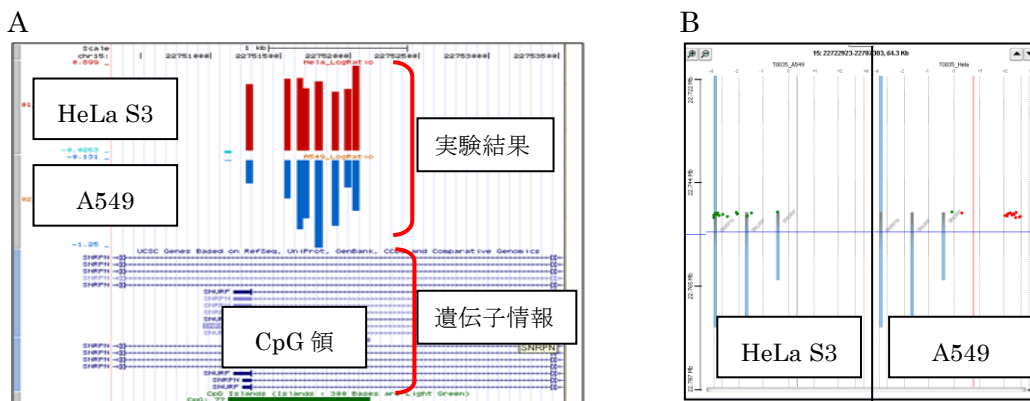


図 4. Agilent Human CpG Island Microarray 解析結果

A) UCSC Genome Browser に解析データを投入し、各領域の濃縮前／後の DNA 量存在比を Bar グラフとして表示した。赤い Bar は濃縮後の DNA 量が濃縮前の DNA 量より多いことを示し、青い Bar は濃縮前の DNA 量が濃縮後の DNA 量より多いことを示している。

B) Agilent Genomic Workbench 5.0 に解析データを投入し、各領域の濃縮前／後の DNA 量存在比をプロットした。青い線は遺伝子情報、赤いプロットは濃縮後の DNA 量が濃縮前の DNA 量より多いことを示し、緑のプロットは濃縮前の DNA 量が濃縮後の DNA 量より多いことを示している。

【3】製品リスト

[NucleoSpin® Tissue \(製品コード 740952.10/.50/.250\)](#)

[EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit \(製品コード 631963、631962\)](#)

c. MeDIP-Seq/hMeDIP

- ◆抗メチル化シトシン抗体/抗ヒドロキシメチル化シトシン抗体を用いてメチル化領域を濃縮
- ◆ゲノムワイドにメチル化領域を解析

【1】原理

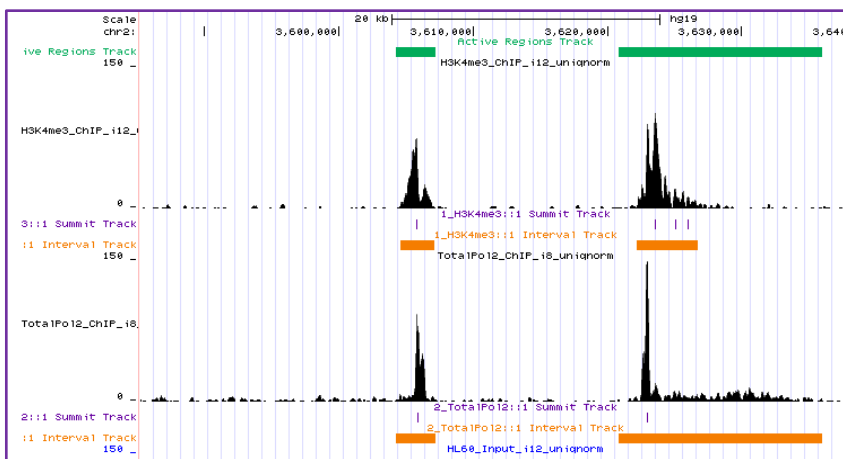
抗メチル化シトシン抗体（または抗ヒドロキシメチル化シトシン抗体）を用いて DNA メチル化領域を濃縮します。細胞や組織からゲノム DNA を抽出し、DNA を断片化します。次に、抗メチル化シトシン抗体とゲノム DNA を混合し、メチル化 DNA を結合し、メチル化 DNA 領域を免疫沈降にて濃縮します。免疫沈降にて取得した DNA を次世代シーケンサーにてシーケンスを行います。シーケンスリードを参照配列にマッピングし、メチル化領域を検出します。

【2】受託サービスのご案内

細胞または組織でご送付ください。経験豊富な Active Motif 社にて ChIP 反応より実施いたします。調整した ChIP 産物をイリミナ社シーケンサーでシーケンスを行います。シーケンスリードを参照配列にマッピングし、リードが集中するエンリッチ領域を検出し（ピークコール）、アノテーション情報を付加したリストを作成します。

クロマチン免疫沈降サンプルの解析 (ChIP-Seq)

<納品データ例：ピークコール結果、アノテーションリスト結果>



Active Region	Chromosome	Start	End	Length	Interval Count	sample1 Avg Value	sample2 Avg Value	sample1 Peak Value	sample2 Peak Value
1	1	712,400	715,599	3,199	3	10.548	14.776	51	29
2	1	761,200	763,199	1,999	2	9.167	7.432	29	22
3	1	839,684	843,599	3,915	2	5.284	5.516	22	
4									

CGIsland Count	Promoter Count	Gene Count	Gene List	Distance to Start	Position	UCSC Link	sample Present
1	2	2	LOC100288069	169, -7321	in gene, upstream	ActReg chr1	
1	3	4	FAM87B, NCRN	9448, 703, -	downstream, in gen	ActReg chr1	
1	1	2	LOC284600, FLJ	-5174, 1317	upstream, downstre	ActReg chr1	
1	2	3	LOC284600, FLJ	12946, -494	downstream, upstre	ActReg chr1	