QX Droplet Digital™ PCR (ddPCR™)とinverse PCRを用いたBACトランスジェニックマウスにおけるゲノム挿入部位及び構造解析

Key words : BACトランスジェニックマウス, ゲノム挿入部位解析, inverse PCR

Research Background

バクテリア人工染色体（BAC）を用いたトランスジェニックマウスの作製手法は、比較的広範な遺伝子領域を遺伝子導入できるメリットを活かしネイティブで生理学的な量的・時空間的発現制御パターンを反映した発現解析や遺伝子治療モデルの樹立に幅広く応用されています。一方で、作製したトランスジェニックマウスの解析結果を解釈する場合、① BACトランスジーンがマウスゲノム上のどの領域に、どのようなオリエンテーションで何コピー数インテクレーションされているか、② またそれによって他の内在性遺伝子に直接的あるいは間接的にどのような影響を及ぼしているのかを事前に把握しておくことは、目的とするBACトランスジーンの正確な解析を行う上で不可欠です。

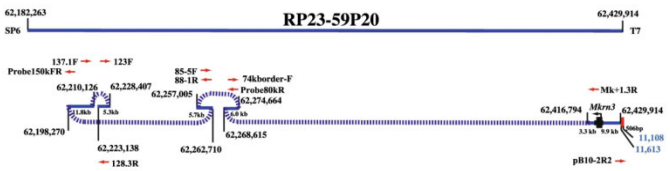
こうしたケースでの確認手法として従来からSouthern BlottingやqPCRを組み合わせたCNV解析が一般的によく用いられてきましたが、近年ではアレイCGH法や次世代シーケンサーを組み合わせた、ゲノム挿入部位及び構造解析も行われるようになりました。しかし煩雑な操作やコストの問題などにより、まだまだ誰でも使用できる汎用技術レベルには至っておりません。

そこで操作が簡便であり正確なコピー数を絶対数として算出できるドロップレットデジタルPCR技術と従来法であるinverse PCR（iPCR）技術を組み合わせた手法を用いて、マウスゲノム上でのBACトランスジーンのコピー数, オリエンテーション及び挿入部位の解析が簡便に行えるか検証が行われました。さらにその手法を用いて父方由来15番染色体短腕q11-q13部位の複数遺伝子欠損により生じるPrader-Willi症候群のモデルマウス（新生仔致死）での、責任遺伝子群のBACトランスジェニックマウス作製と解析に応用可能か更なる検証が遂行されました。

Content

今回、長崎大学 先導生命科学研究支援センター 遺伝子実験施設の 木住野 達也 先生のグループがScientific Reports誌でご報告された BACトランスジェニックマウスにおけるトランスジーンの挿入部位・構造解析手法としてのddPCRアプリケーションについてご紹介します。

(A)



(B)

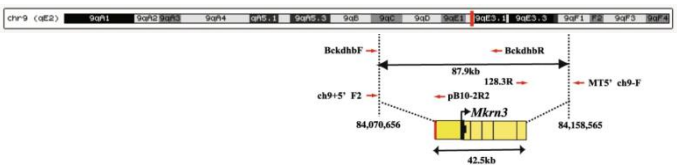


図1 解析で明らかになったBACクローン RP23-59P20トランスジェニックマウスにおけるBAC挿入断片と導入先のゲノム構造

ddPCR技術と従来法であるinverse PCR技術を組み合わせ、上段BACクローンRP23-59P20全長の内、（A）下段の**青実線**のようなオリエンテーションでBACクローンの部分断片の挿入があること、またBACクローンRP23-59P20中のMkrn3遺伝子部分断片がマウス9番染色体長腕E2領域に存在するBckdhb遺伝子座のExon9,10を含む領域に飛び込んでいることが判明しました（B）。

今回ご紹介する文献のデータよりQX200 Droplet Digital PCR（ddPCR）を用いた絶対定量による遺伝子コピー数検出は、CNV変化を再現性良く正確に検出でき、下記の利点もあげられます。

Application Advantages

- CNV変化による領域特異的な遺伝子導入領域の確認が容易に検出可能
- 複数のタンデムなPrimer/Probe系を用いたCNV測定のアッセイデザインにより、より簡便に遺伝子導入/ 欠損領域の限定化が可能
- トランスジェニック動物や安定発現株などでの遺伝子導入領域の正確な把握やコピー数・導入遺伝子の形状維持管理にも有用

BIO-RAD

(A)

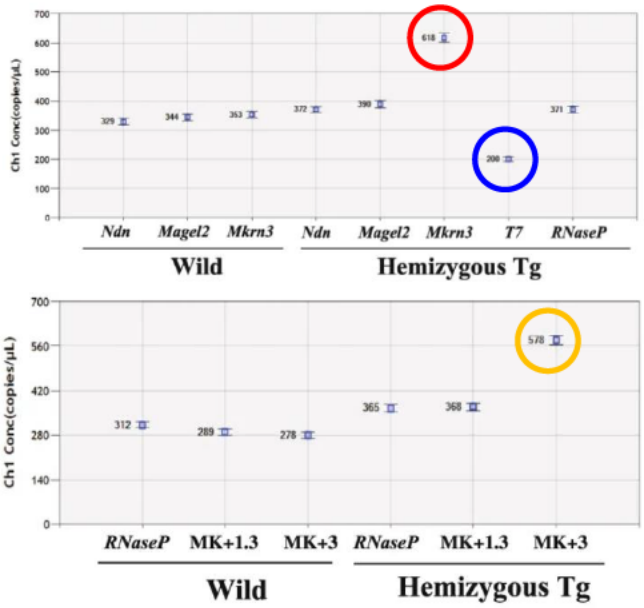


図2 BACトランスジェニックマウスにおける 遺伝子導入部位及コピー数解析

野生型及びヘテロTgマウスにおけるBACベクター上の各遺伝子のコピー数解析。BACトランスジェニックマウスでは、内在性のMkrn3遺伝子2コピーに加え、1コピーのMkrn3遺伝子挿入が生じており（上段, 赤○）, またBACベクター上のT7配列の1コピーの挿入が生じている事が判明した（上段, 青○）。図下段は野生型及びヘテロTgマウスにおけるMkrn3遺伝子の各領域に関するコピー数解析を示している。BACトランスジェニックマウスではMkrn3遺伝子のMk+3領域が1コピー挿入されていることが判明した（下段, 橙○）。

(B)

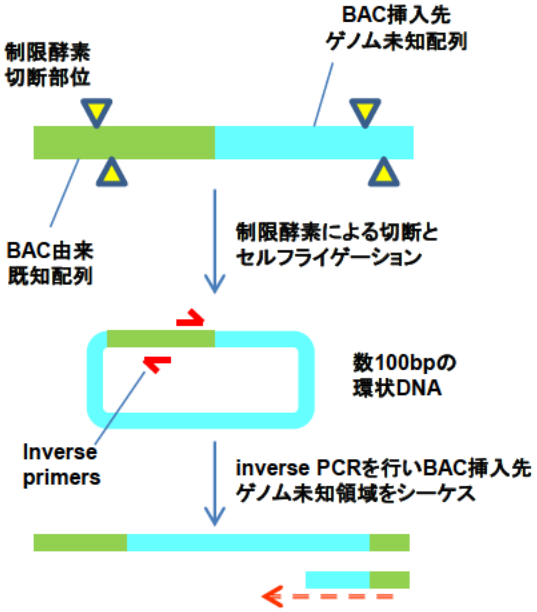


図3 iPCRとそれに続くシークエンス解析ワークフロー

iPCRとそれに続くサンガーシケンシングにより、容易にトランスジーンとゲノム由来のつなぎ目配列が決定される。

Conclusion

今回の論文により、ドロップレットデジタルPCR技術によりトランスジーンのコピー数確定は勿論のこと、簡単にトランスジーン挿入部の境界候補領域を非常に狭い領域まで狭めることが出来ました。これによりChromosome Walking 技術のひとつである iPCRを行う際の制限酵素処理で、平均数百bpサイズに切断可能な4base cutterを選択可能となり、iPCRによるつなぎ目部分を含む遺伝子断片のサイズを小さくすることで、ライゲーションとiPCRの成功、それに続くサンガーシーケンシングによる精確な挿入部位配列の確定を簡便に行う手法が開発されました。

※ 本資料作成に当たり、今回長崎大学 先導生命科学研究支援センター 遺伝子実験施設の 木住野 達也 先生よりデータをご提供頂いております。

Publication

Application of droplet digital PCR in the analysis of genome integration and organization of the transgene in BAC transgenic mice

Ayumi Nakagaki, Asuka Urakawa, Shiori Hirano, Takeru Anami & Tatsuya Kishino.

Sci Rep. 2018 Apr 27;8(1):6638.

Related Articles

・**A rapid molecular approach for chromosomal phasing.**
Regan JF, Kamitaki N, Legler T, Cooper S, Klitgord N, Karlin-Neumann G, Wong C, Hodges S, Koehler R, Tzonev S, McCarroll SA.
PLoS One. 2015 Mar 4;10(3):e0118270.

論文検索サイト

ddPCRを用いた論文の検索サイトはこちら （www.bio-rad.com/ddPCR/publications）

BIO-RAD バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社 取扱店

ライフサイエンス www.bio-rad.com
本 社 〒140-0002 東京都品川区東品川 2-2-24 TEL：03-6361-7000
大阪営業所 〒532-0025 大阪市淀川区新北野 1-14-11 TEL：06-6308-6568
福岡営業所 〒812-0013 福岡市博多区博多駅東 2-5-28 TEL：092-475-4856
※学術的お問い合わせは TEL：03-6404-0331

※価格(税抜き）、仕様などは予告無く変更することがありますので、ご了承ください。
※価格は2019年7月現在のもので、メーカー希望小売価格（税別）です。
※本カタログに記載されている会社名、商品名は各社の商標または登録商標です。

C12124L 1907a