速 報

キャピラリー電気泳動による DNA シークエンシング反応
生成物の高速分離富崎 理代, 馬場 嘉信®, 津波古充朝*

(1994 年 8 月 29 日受理)

1 緒 言

キャピラリー電気泳動¹⁾及びキャピラリーアレイ電気泳動²⁾は、高速 DNA シークエンサとして、30 億塩基対もの膨大な情報を有するヒトゲノムを解析するために必要な新規 DNA 解析装置である。これらの装置を用いて、DNA シークエンシングの高速化を実現するには、キャピラリー電気泳動によるシークエンシング反応生成物の高速分離を達成する必要がある。これまでに、キャピラリー電気泳動によるシークエンシング反応生成物の分離条件の最適化について幾つかの報告があるが^{3)~6)}、最も高速化した例でも 30 分で 300 塩基程度を解析しているに過ぎず、ヒトゲノムのような巨大な DNA の全塩基配列を決定するには不十分である。本研究においては、著者らが開発したキャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出装置⁷⁾を用いて、シークエンシング反応生成物の高速分離を達成するために、ゲル組成、電圧、キャピラリー長が分離に及ぼす影響について検討した。本研究においては、特に 300 塩基以下のシークエンシングに焦点を絞って分離条件の最適化を行った。

2 実 験

DNA シークエンシングのためのキャピラリー電気泳動-レーザー蛍光検出装置は既に報告したものをを用いた⁷⁾。DNA の分離には、ポリアクリルアミドゲルあるいは非架橋ポリアクリルアミドを充てんしたキャピラリーを用いた⁸⁾。

DNA シークエンシング反応生成物は、蛍光試薬 (JOE) でラベル化したプライマー (-21M13, アプライドバイオシステムズ製) を用い、M13mp18DNA (タカラ製) をテンプレートとし、Taq Dye Primer Cycle

Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ製) により生成したものをエタノール沈殿し、脱イオンホルムアミド 4 μ l に溶かしたものをを用いた。サンプルは 90°C で 2 分間熱変性を行った後、電気泳動的に注入した。

3 結果と考察

高速 DNA シークエンシングを達成するために、ゲル濃度 (3~6% T®)、架橋度 (0~5% C®)、電場 (200~414 V/cm)、キャピラリー有効長 (15.3~36.3 cm) をそれぞれ変化させて DNA シークエンシング反応生成物の分離条件の最適化を行った。

ゲル濃度は、分離速度に大きく影響し、濃度が小さいほど高速化が達成できた。しかし、ゲル濃度が小さくなると分解能は低下した。これに対して、架橋度を変化させても分離速度はあまり変化しなかった。又、分離速度は、電場に比例し、キャピラリー有効長に反比例した。しかし、これらのパラメーターは、測定範囲内で分解能にほとんど影響を及ぼさなかった。これらの検討により、分解能を低下させずに DNA シークエンシングを高速化するには、比較的高いゲル濃度を用い、高電圧で短いキャピラリーを用いる必要があることが分かった。これは、300 塩基以下のシークエンシングに関する最適条件であり、これ以上の DNA シークエンシングについては、異なる最適条件を検討する必要がある。

Fig. 1 に高速 DNA シークエンシングの一例を示す。これは、ゲル濃度 6% T、架橋度 0% C、電場 414 V/cm、キャピラリー有効長 15.3 cm の条件で、塩基 A で終結したシークエンシング反応生成物を分離し、レーザー (488 nm) で励起した蛍光を 560 nm で検出したものである。図に示すように、100 塩基までの DNA フラグメントは完全に分離しており、コンピュータ解析により 250 塩基程度までの配列を決定することが可能である。しかも、解析は 10 分以内に終了しており、従来の

* 神戸薬科大学: 658 兵庫県神戸市東灘区本山北町 4-19-1

Fig. 1 Separation of JOE-labeled A-termination sequencing reaction product of M13mp18 by capillary electrophoresis

Excitation : 488 nm argon ion laser; Detection : 560 nm; Capillary : 100 μ m i.d., 200 μ m o.d., 29 cm length, 15.3 cm effective length, 6%T, 0%C; Running buffer : 0.1 M tris-borate and 7 M urea, pH 8.6; Field : 414 V/cm, 33 μ A; Injection : 10 kV for 10 s

キャピラリー電気泳動によるシーケンシング^{(3)~(6)}より2~3倍の高速化を達成できることが明らかとなった。以上のように、分離条件の最適化により300塩基以下のDNAシーケンシングの大幅な高速化を実現した。現在、更なる高速化を目指して条件のより詳細な検討を行っている。又、300塩基以上のDNAシーケンシングの最適条件についても検討中である。

本研究は、文部省科学研究費（創成的基礎研究「ヒト・ゲノム解析研究」、がん特別研究、重点領域研究）、日本私学振興財団、上原記念生命科学財団、ひょうご科学技術創造協会、日本油脂（株）筑波研究所の援助を得て行った。

文 献

- 1) L. M. Smith: *Science* (Washington, D.C.), **262**, 530 (1993).
- 2) H. Kambara, S. Takahashi: *Nature* (London), **361**, 565 (1993).
- 3) D. Figeys, N. J. Dovichi: *J. Chromatogr.*, **645**, 311 (1993).
- 4) J. A. Luckey, L. M. Smith: *Anal. Chem.*, **65**, 2841 (1993).
- 5) M. C. Ruiz-Martinez, J. Berka, A. Belenkii, F. Foret, A. W. Miller, B. L. Karger: *Anal. Chem.*, **65**, 2851 (1993).
- 6) T. Nishikawa, H. Kambara: *Electrophoresis*, **15**, 215 (1994).
- 7) R. Tomisaki, Y. Baba, M. Tsuchiko, S. Takahashi, K. Murakami, T. Anazawa, H. Kambara: *Anal. Sci.*, **10**, 817 (1994).
- 8) Y. Baba, T. Matsuura, K. Wakamoto, Y. Morita, Y. Nishitsu, M. Tsuchiko: *Anal. Chem.*, **64**, 1221 (1992).

Rapid separation of DNA sequencing reaction product using capillary electrophoresis Riyo TOMISAKI, Yoshinobu BABA and Mitsutomo TSUHAKE (Department of Chemistry, Kobe Pharmaceutical University, 4-19-1, Motoyamakitamachi, Higashi-nada-ku, Kobe-shi, Hyogo 658)

The effect of the gel composition, electric field strength, and capillary length on the separation of DNA sequencing reaction product was investigated in order to achieve high-speed DNA sequencing on a large-scale for the Human Genome Project. In this study, we prepared gel-filled capillaries differing in gel concentration (3%T~6%T), degree of

crosslinking (0% C~5% C), and capillary length (15.3 cm~36.3 cm). Fluorescence-labeled A-termination sequencing reaction product (M13mp18 template) was first separated by capillary electrophoresis using the gel-filled capillaries prepared here in electric fields from 200 V/cm to 414 V/cm and then detected at 560 nm by using an on-line argon ion laser (488 nm)-induced fluorescence detector. In conclusion, the use of the short capillary, high concentration gel, and high electric field realizes high-speed separation of DNA sequencing reaction product with high resolution. Under optimum separation conditions, only 10 min is required for sequencing of 250-base DNA.

(Received August 29, 1994)

Keyword phrases

capillary electrophoresis; high-speed DNA sequencing; optimization of separation conditions; laser-induced fluorescence detection.