

ケーススタディ: Fragment Analyzer System

イリノイ大学における ロングリードシーケンスのための 植物組織からの新しい DNA 抽出メソッド

植物の新規ゲノムアセンブリ

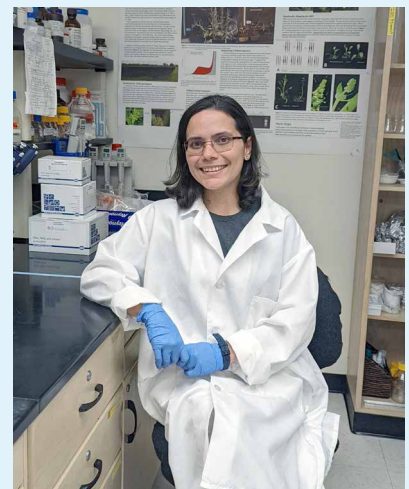
イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校の研究者の Dessireé Zerpa-Catanho 博士、Ray Ming 博士、Alvaro Hernandez 博士は、先日、研究チームの他のメンバーとともに独自の DNA 抽出メソッドを発表しました。これは、Oxford-Nanopore 社のロングリード次世代シーケンシング (NGS) に適した、高純度かつ高分子量 (High Molecular Weight : HMW) の植物 DNA の抽出用に開発されました。¹。

このメソッドは、パパイヤ科 (パパイヤなどの食用果実を含む熱帯顕花植物の科の 1 つ) の植物の新規ゲノムアセンブリを目的としたロングリードおよびウルトラロングリードシーケンスに用いられ、この経済的に重要な植物の科の性決定経路とその進化の歴史に関する研究の進展が期待されます。

植物組織から得られる長い DNA フラグメントは新しいゲノムアセンブリの生成に欠かせません。「植物の de novo ゲノムアセンブリに関わる問題として、反復配列が多く含まれることが挙げられますが、長い DNA フラグメントを得ることでその問題を解決することができます。一方、短いフラグメントでは良いアセンブリを得ることは基本的に不可能です」と Zerpa-Catanho 博士は話します。

植物組織から得られる高分子量 DNA

これまでの方法では、ロングリードシーケンスに最適な品質と量の DNA を抽出することは困難であったため、研究チームは長い DNA フラグメントを得るために、植物組織専用の手法を開発する必要性がありました。重要なポイントの 1 つが、植物の新鮮な葉を使用することでした。研究チームは若い植物組織を使うことで、HMW DNA の純度が向上することに気づきました。「病気の兆候がない、新鮮な若い葉を好んで使用しました。というのも、成長した植物の葉には、多糖やポリフェノールなどの夾雑物が高濃度で含まれていることがあるためです」と Zerpa-Catanho 博士は述べています。研究チームはサンプリングに新鮮な葉を使うことに加えて、タンパク質やフェノールといった有機化合物などの残留不純物に対処するためにシーケンシングの前に精製ステップを実施しました。



Dessireé Zerpa-Catanho 博士

研究員
イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校
USA

DNA の品質と量はロングリード NGS の成功を左右するもう 1 つの重要な要素です。「最初の抽出で十分な核を採取できなければ、おそらく十分な DNA を得られないでしょう」と Zerpa-Catanho 博士は述べます。高品質のフラグメントを大量に抽出するためには、ワークフロー全体を通して、サンプルを丁寧に扱い、ワイドボアピペットチップといった特殊な器具を使用することが重要です。「抽出する間はサンプルを丁寧に扱うことが大切です。ロングリードまたはウルトラロングリード DNA シーケンシングを行う場合は、DNA すべてを断片化したくないからです」と Zerpa-Catanho 博士は述べます。そこで、抽出した DNA の品質と量をさまざまな品質評価を用いて検証しました。

さまざまな品質評価方法

研究チームは、さまざまなサンプル品質評価法を選択することで、DNA 抽出物に含まれる DNA フラグメントの純度が高く、ロングリードおよびウルトラロングリードシーケンシングに適した長さを備えていることを確認することができました。まず、DNA 量の測定と純度評価には UV-Vis 分光光度法や蛍光光度法を用いました。つぎに Zerpa-Catanho 博士はアガロースゲル電気泳動を行うことで、サンプル中の長い DNA フラグメントの存在を確認しました。アガロースゲルでは、長い DNA フラグメントと、多量であれば短い DNA フラグメントを検出することはできましたが、少量の短い DNA フラグメント (<50 kb) の確認は困難でした。

DNA サンプル内の短いフラグメントの有無の判定を向上させるため、Zerpa-Catanho 博士はイリノイ大学アーバナ・シャンペーン校 DNA サービス機関のディレクタ Alvaro Hernandez 博士と協力して作業を行いました。Hernandez 博士により、Agilent Fragment Analyzer System の使用が提案されました。「DNA の断片化や分解が起こっていないことを確認するために、Hernandez 博士から Fragment Analyzer の使用が提案されました。Fragment Analyzer を使うことで短いフラグメントを確認することができました」と Zerpa-Catanho 博士は話します。Fragment Analyzer System で得られたデータはエレクトロフェログラムで示されるため、たとえ少量の短いフラグメントが広がっていても容易に確認できます。Fragment Analyzer System による客観的データはレポートとして表示され、これにより研究チームはサンプルの品質と長さがロングリードシーケンシングに適切かどうかを確かめることができました。このようにして得られた結果から、DNA 抽出メソッドが目的どおり機能していることが確認できました。

Agilent Fragment Analyzer System の詳細については、
<http://www.agilent.co.jp/chem/fragment-analyzer> をご覧ください。

[お問い合わせ窓口]

アジレント・テクノロジー株式会社

本社 / 〒192-8510 東京都八王子市高倉町9-1

●カスタマコンタクトセンター ☎ 0120-477-111

mail : email_japan@agilent.com

※仕様は予告なく変更する場合があります。

※本資料掲載の製品はすべて試験研究用です。

診断目的にご利用いただくことはできません。

G220487

<http://www.agilent.com/chem/genomics:jp>

© Agilent Technologies, Inc. 2022

本書の一部または全部を画面による事前の許可なしに複製、改変、翻訳することは、著作権法で認められている場合を除き、法律で禁止されています。

Printed in Japan, January 1, 2022

5994-4390JAJP

植物のゲノムアセンブリ研究の始まり

この研究チームが開発した抽出メソッドにより、平均 25 kb のリード分布が得られる高純度のサンプルが作製でき、得られたリードはパパイヤ科のさまざまな種の新規ゲノムアセンブリに使用されます。さらに、このメソッドにより、HMW DNA を抽出する際のリソースを節約することができました。「私たちは HMW DNA をより経済的な方法で抽出することができました。もし受託ラボにサンプルを依頼すると、抽出のために多額の費用を支払わなくてははいけません」と Zerpa-Catanho 博士は話します。

Zerpa-Catanho 博士と研究チームは、植物組織から適切な DNA を採取し Oxford-Nanopore ロングリードシーケンシングを行うために、この抽出メソッドを確立しましたが、今後は PacBio や Illumina シーケンシング技術など別のアプリケーションにこのメソッドを使用することを考えています。また、研究チームは、このメソッドはパパイヤ科以外の植物の解析にもうまく利用できるのではないかと期待しています。ゲノムアセンブリが行われていない種がまだ多い状況ですが、「植物においては、多くのゲノムアセンブリが日々、着々と行われています」と Zerpa-Catanho 博士は話します。

結論

研究チームは、いくつもの技術的な課題を克服し、植物組織用の確実でコスト効率の高い DNA 抽出メソッドの開発に成功しました。このメソッドにより、Oxford-Nanopore ロングリードおよびウルトラロングリードシーケンシングのための高純度の HMW DNA を得ることができ、得られたデータはパパイヤ科の植物の新規ゲノムアセンブリに使用されます。シーケンシングを行う前には DNA の品質と量をさまざまな手法で評価する必要があります。Agilent Fragment Analyzer System を用いることで HMW DNA のサイズや短い DNA フラグメントの有無を評価することができます。

参考文献

1. Zerpa-Catanho, D; Zhang, X; Song, J; Hernandez, AG; Ming, R. Ultra-Long DNA Molecule Isolation from Plant Nuclei for Ultra-Long Read Genome Sequencing. Cell **2021**, 183, 875-889.e117. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100343>