

## ～全自動電気泳動装置 MultiNA のご紹介～



(株)島津製作所 分析計測事業部

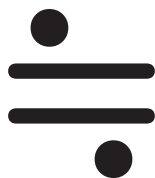
 **SHIMADZU**

## MultiNAはどんな装置？

DNA/RNAのサイズを測定する装置です。



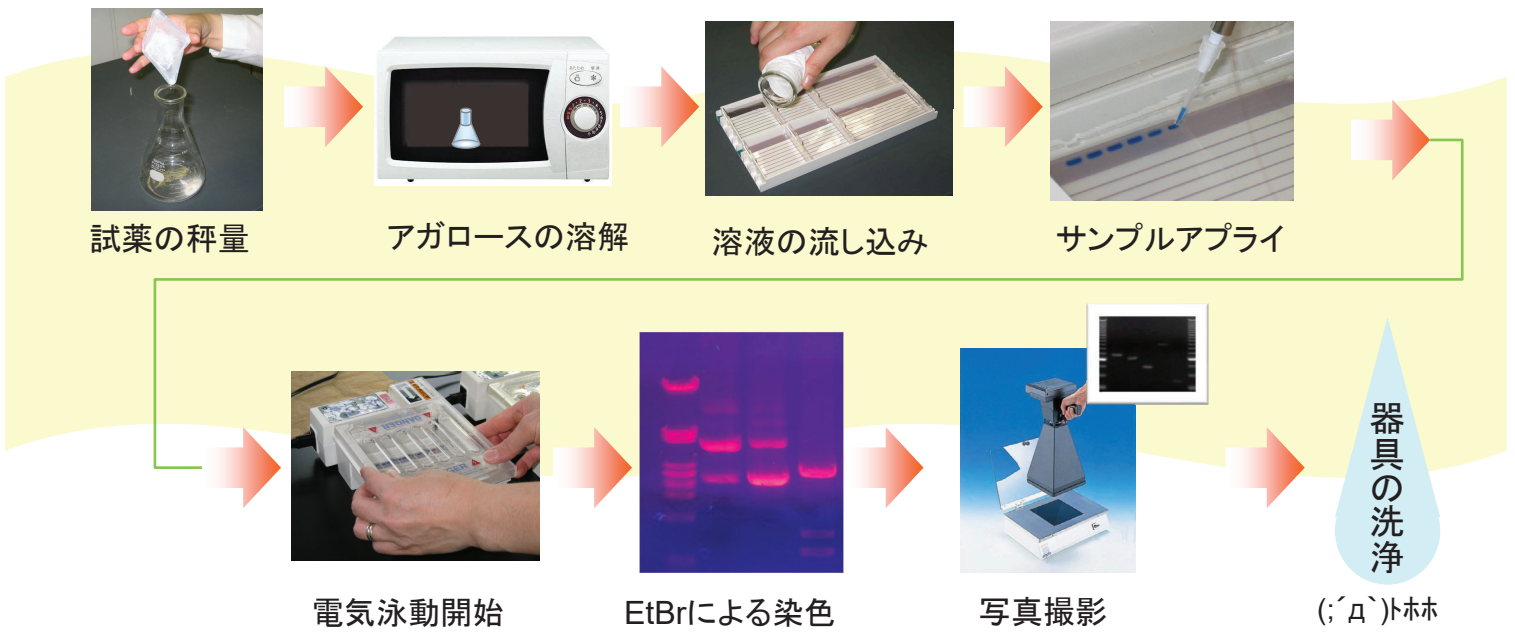
MultiNA



アガロースゲル電気泳動

# 従来法(アガロースゲル電気泳動)

の不满を解消します



- ・アガロースゲル電気泳動は手作業の連続
- ・EtBrの発ガン性
- ・数サンプルでも1枚のゲルを使用
- ・ゲル毎に移動度が変化
- ・プレキャストゲルは高価

# アガロースゲル電気泳動の不满点



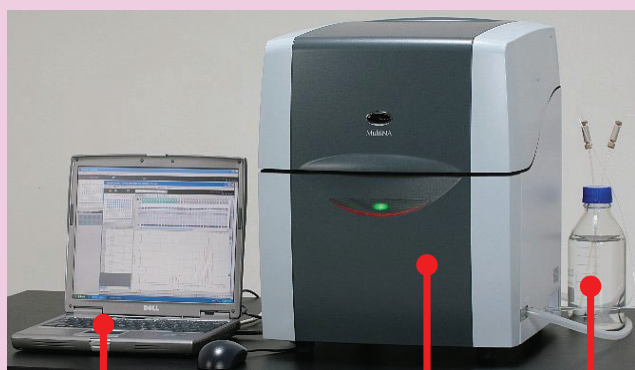
- “数値”としてデータが得られない。
- 感度が足りない
- ゲル(分析)ごとに比較できない。

アガロースゲル電気泳動の写真による評価は

1. 目視判定なので**主観**がどうしても入ってしまう
2. 結果が**数値**にならないので客観性に乏しいという問題を避けることができません。

# MultiNAシステムの構成

## 装置の構成



PC(装置制御、結果閲覧)

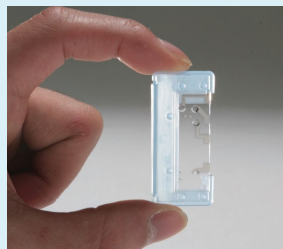
洗浄水

装置本体

・オートサンプラーが内臓されているため自動分析が可能。

## 主な消耗品

### ● マイクロチップ(電気泳動用デバイス)



・繰り返し使用が可能

・1~4枚まで搭載可能

▽  
複数枚使用で処理能力UP!

### ● 試薬キット (DNA用4種類、RNA用1種類)



DNA-500 (25~500bp)

DNA-1000 (100~1000bp)

DNA-2500 (100~2500bp)

DNA12000 (100~12000bp)

RNA (28SrRNA:5000ntまで)

5

# MultiNAのコンセプトと特徴

## アガロースゲル電気泳動の不満を解決する分析システム

### 特長1 全自動分析

サンプルと試薬をセットするだけなのでオーバーナイトで分析が可能!  
1サンプル~最大108(96+12)サンプルまで自動分析

### 特長2 低ランニングコスト・簡単メンテナンス

アガロースゲル電気泳動に匹敵する低コストを実現!  
再利用できるマイクロチップと専用試薬キット、分析前後に自動洗浄

### 特長3 高感度検出

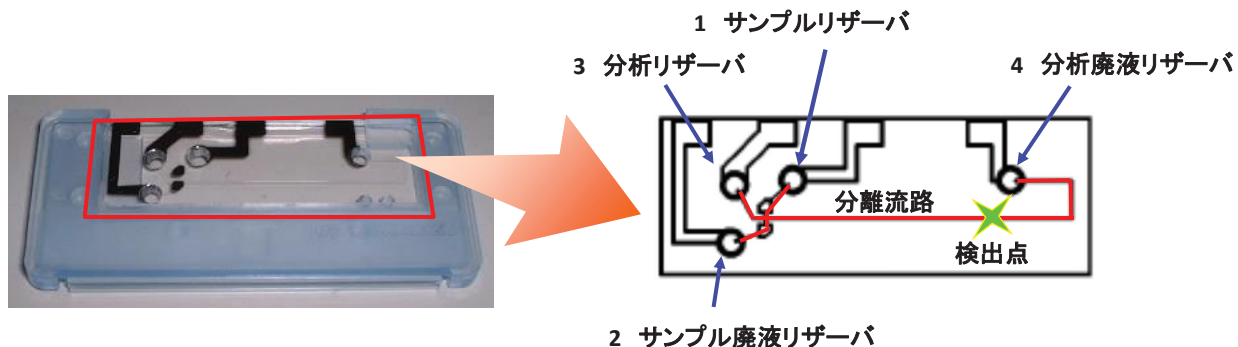
アガロースゲル電気泳動の約一桁以上の感度  
有害なエチジウムブロマイドは使用しません

### 特長4 データ管理・共有も簡単

デジタルファイルとして管理できる  
過去データとの比較も簡単!

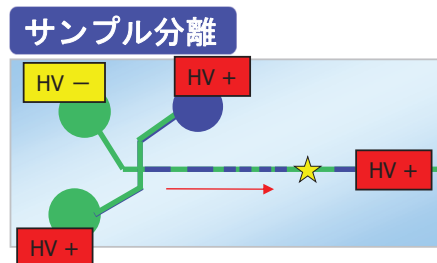
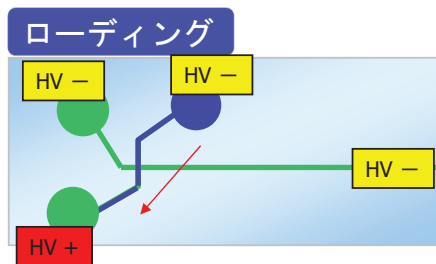
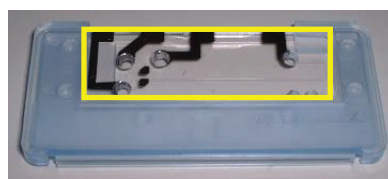
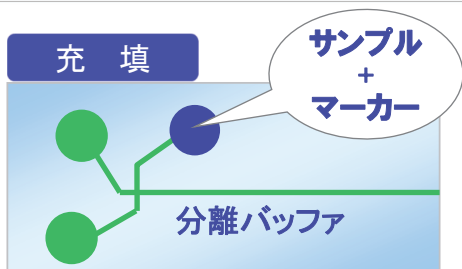
6

# マイクロチップの構造



- 1. 石英製
- 2. 繰り返し使用できる
- 3. 最大4枚までセット可能

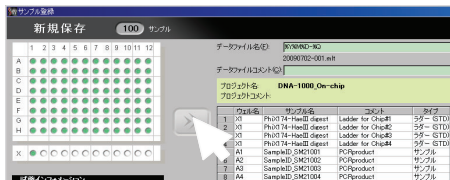
# マイクロチップ電気泳動の原理



# 操作は簡単3ステップ

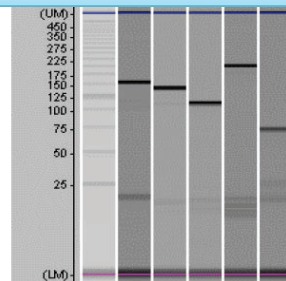
Point! 検体数が多くても、手間は変わらず簡単!

## ① 分析スケジュールの作成・登録



マウス操作だけで  
サンプル登録も簡単!

自動分析の結果を待つだけ!



準備はわずか10~15分

## ② 試薬/サンプルのセット

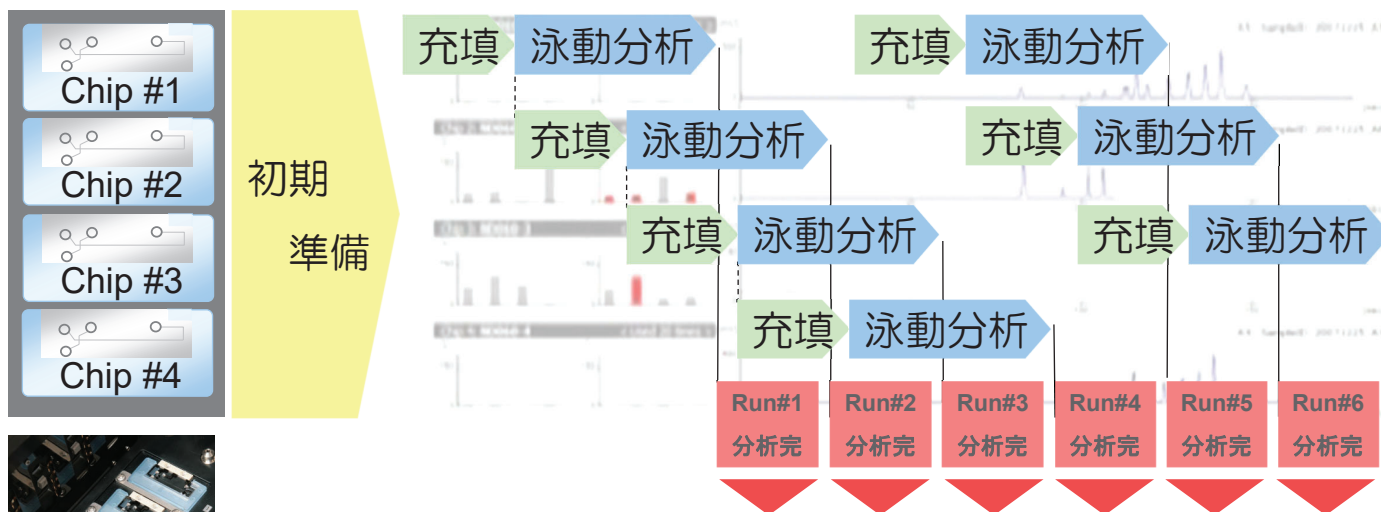


- ・PCRチューブや96wellプレートのまま1~108サンプルまでセット。
- ・試薬を必要量だけ分注、無駄が無い!
- ▶ ゲルの作成は一切不要です。

## ③ 分析の開始

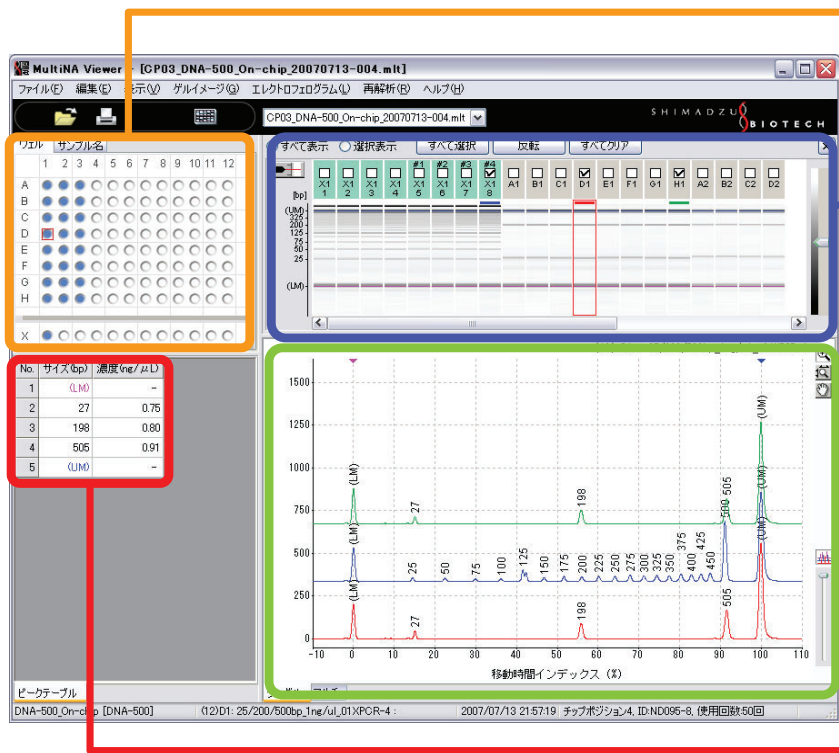


# MultiNAの自動分析の流れ



分析が終わったサンプルから、データを次々と見ることができます。  
すべてのサンプル分析を待つ必要はありません。  
データが得られるまでの時間：12分析→およそ25分、96分析→およそ2時間40分

# MultiNAで得られる結果



## サンプルウェル表示

⇒分析の進行状況を一目で確認。  
⇒見たいサンプルを容易に選択

## ゲルイメージ

⇒ゲル写真と同等の画像データ  
⇒選択したレーンのみ表示可能。  
⇒過去データとの比較も可能。

## エレクトロフェログラム

⇒波形データの比較により、サイズ差や微量フラグメントの存在を明瞭に確認。

## ピークテーブル

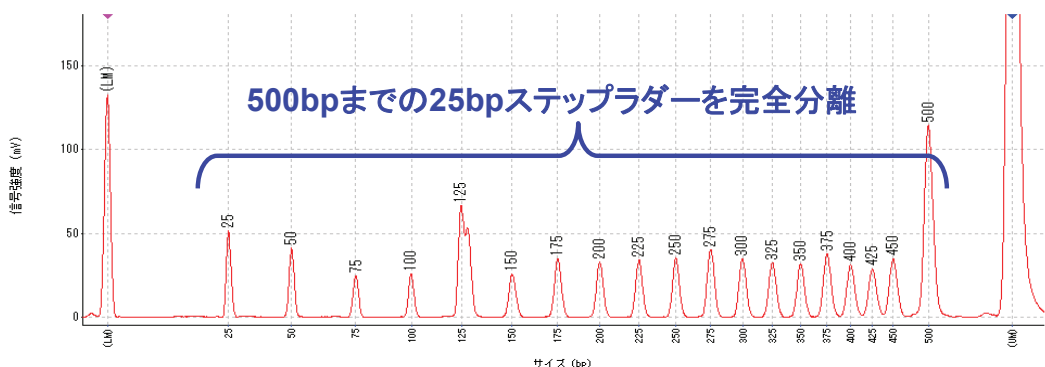
⇒各DNAフラグメントのサイズ推定値や濃度を自動算出。

# 分析性能① 高い分離能

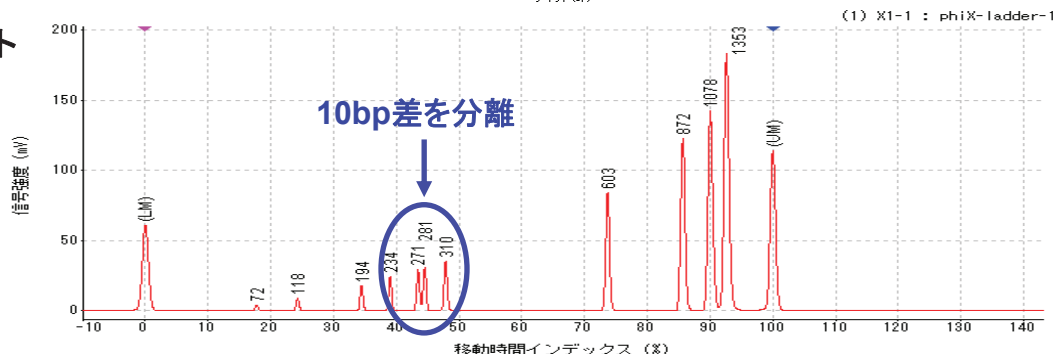


アガロースゲル電気泳動では**識別困難な鎖長差を分離可能。**

## ●DNA-500キット

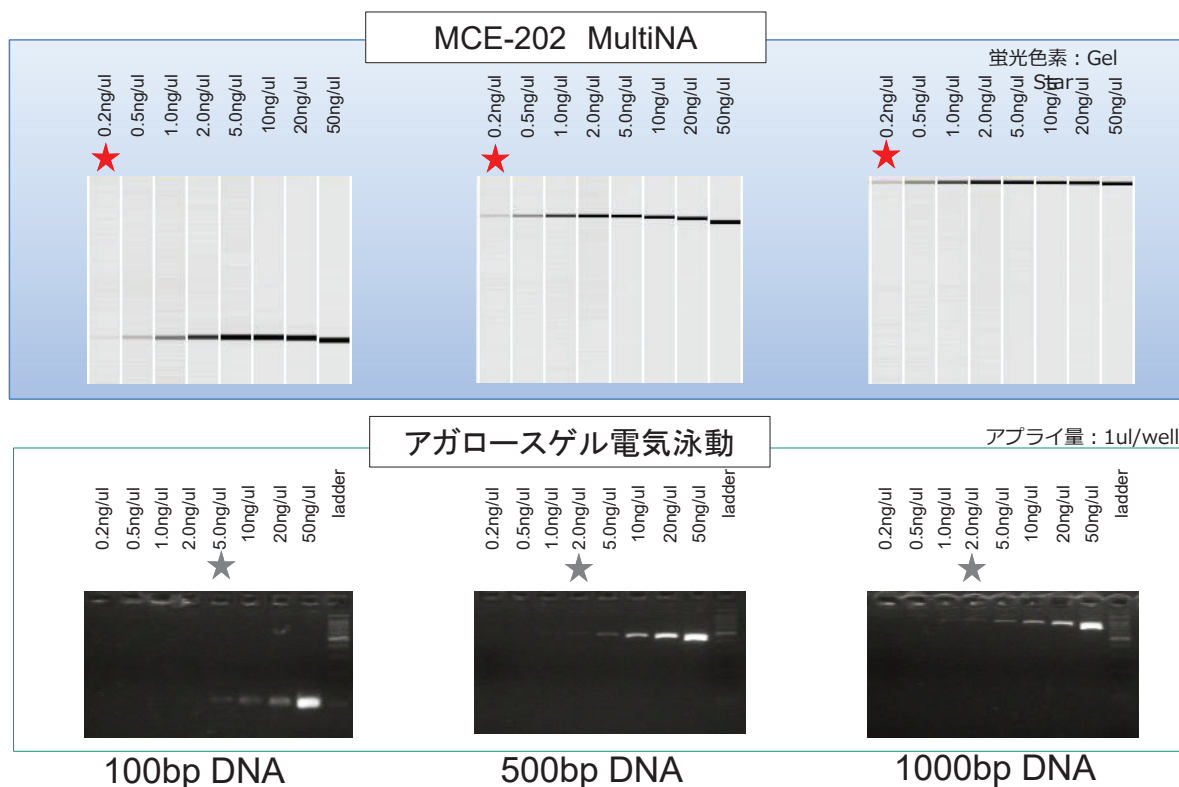


## ●DNA-1000キット



## 分析性能② 高感度検出

MultiNAはアガロースゲル電気泳動に比べて**一桁以上高感度**です。

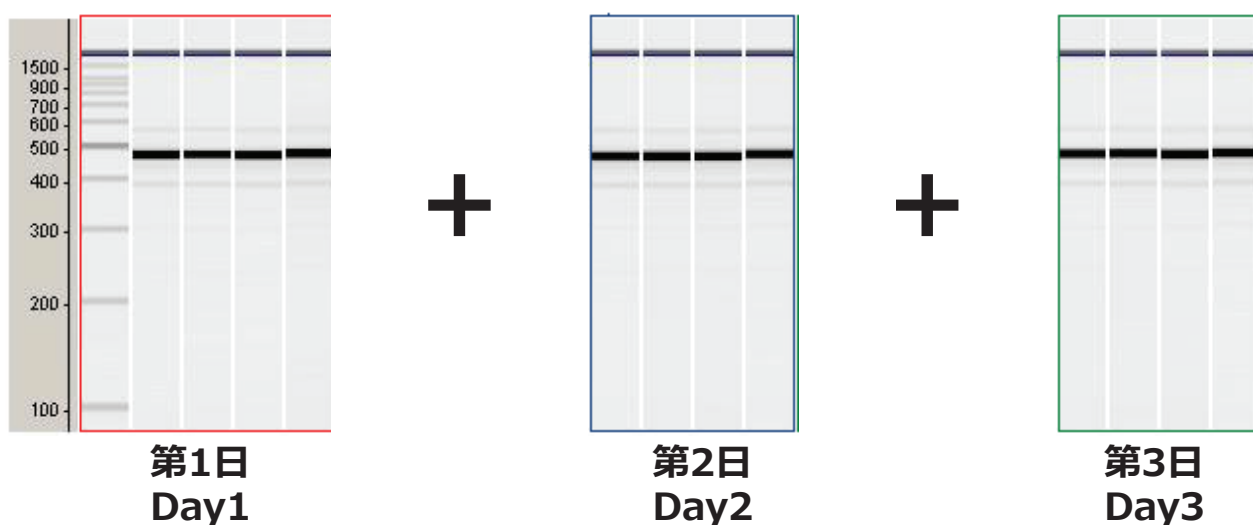


13

## データの並び替えが可能

**「比較ビュー」**という機能を使ってデータの並び替えができます

※泳動条件が同一でなければなりません。



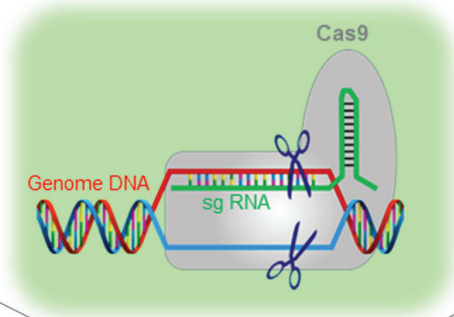
- ・ サンプルの順番を変えたい場合
- ・ 別の時に分析したデータと比較したい場合



**便利です**

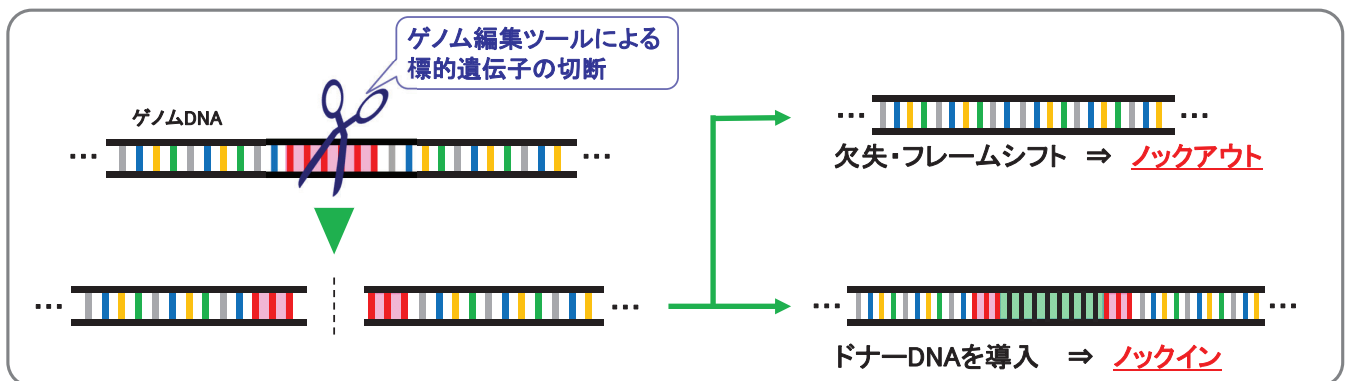
## MultiNA アプリケーション紹介

# CRISPR/Cas9等を用いた“ゲノム編集”のチェック



## ゲノム編集ツール

### ゲノム編集



### ゲノム編集ツール

CRISPR/Cas9

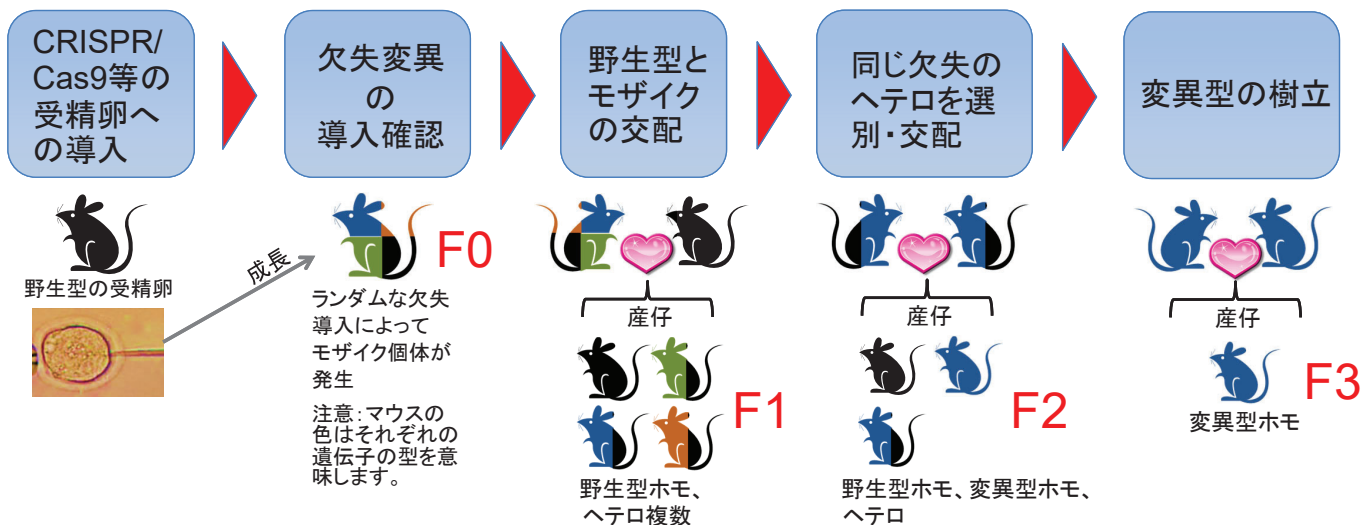
TALEN

ZFN

切断認識配列をユーザーが設計できるので特定の遺伝子を狙い撃ち！

# ゲノム編集によるノックアウト固体の樹立

## ●ゲノム編集のワークフロー



### 編集ツールの活性確認

- ミスマッチ切断酵素は**手間**
- 酵素活性自体が**結果に影響**

### 全個体の欠失有無や遺伝子型確認

- 欠失領域の**DNAシーケンシング(高コスト)**
- **労力、時間がかかる**

# ゲノムに導入した変異の検出方法

まずは標的部周をPCRにより増幅する。 ➡ 配列分析するのが確実

## Cel I アッセイ

(遺伝子変異によるヘテロデュプレックスDNAのミスマッチを認識して切断する酵素)

## HMA

(Heteroduplex Mobility Assay、ヘテロ二重鎖移動度解析)

## RFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism、制限酵素断片長多型)

## RGEN-RFLP

(RNA Guided Endonuclease Restriction Fragment Length Polymorphism、RNA誘導型ヌクレアーゼ制限酵素断片長多型)

# ゲノムに導入した変異の検出方法

まずは標的部周をPCRにより増幅する。 ➡ 配列分析するのが確実

## Cel I アッセイ

(遺伝子変異によるヘテロデュプレックスDNAのミスマッチを認識して切断する酵素)

## HMA

(Heteroduplex Mobility Assay、ヘテロ二重鎖移動度解析)

## RFLP

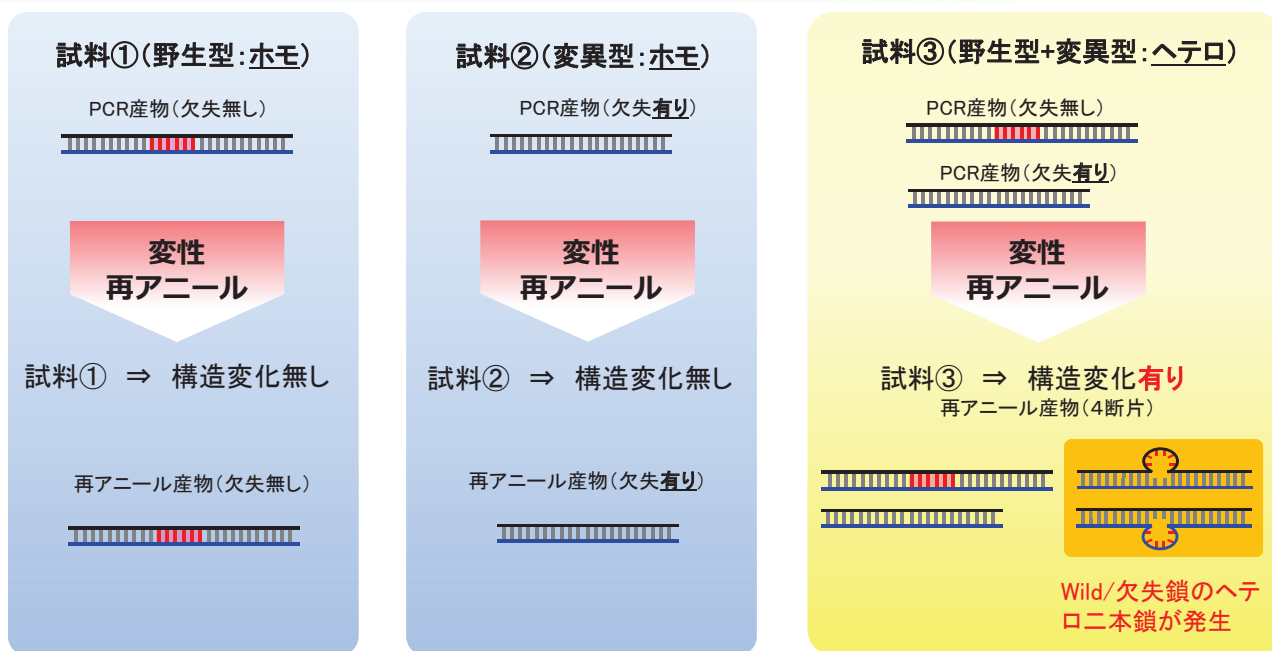
(Restriction Fragment Length Polymorphism、制限酵素断片長多型)

## RGEN-RFLP

(RNA Guided Endonuclease Restriction Fragment Length Polymorphism、RNA誘導型ヌクレアーゼ制限酵素断片長多型)

19

# MultiNA × ヘテロ二重鎖移動度分析 (HMA) 例



電気泳動による  
ヘテロ二本鎖を分離・検出

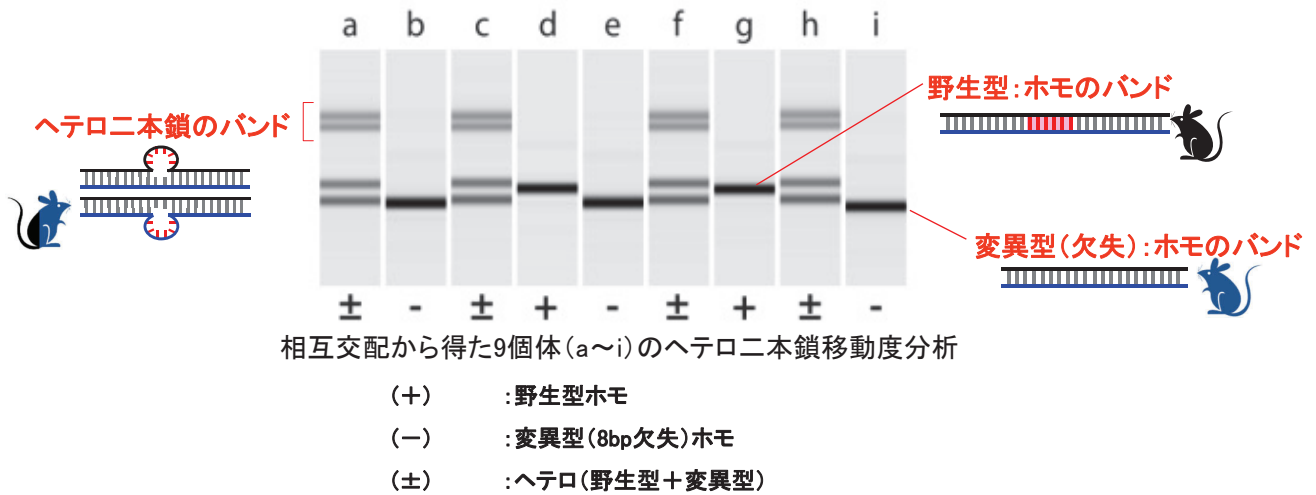


全自動電気泳動装置  
MCE-202 MultiNA

20

# MultiNA × ヘテロ二重鎖移動度分析 (HMA) 例

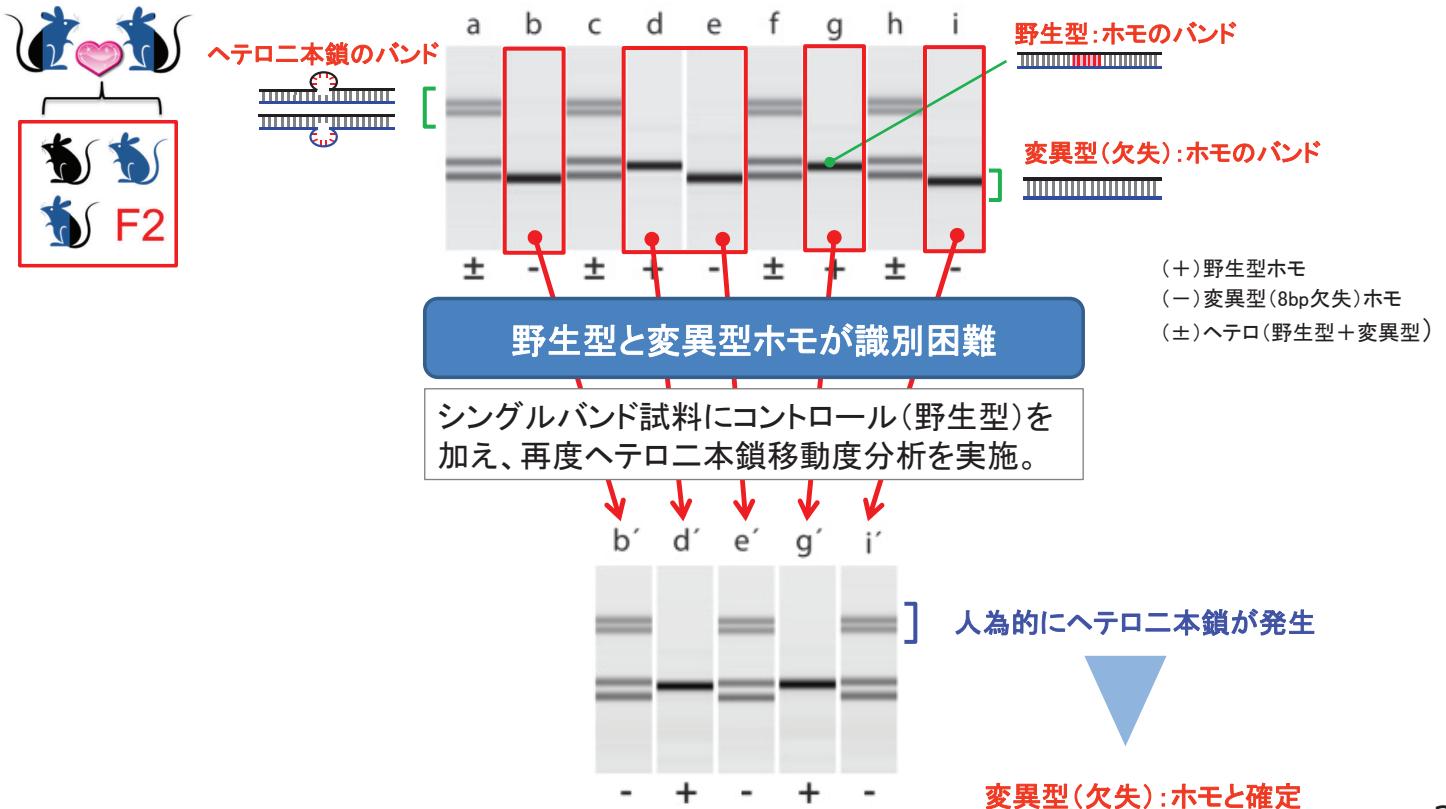
## MultiNAでの分析例



★ヘテロのバンドパターンは高い再現性 & 欠失サイズに応じて固有のパターン

DNAの配列解析を行わなくても欠失を判別できる。

## F2固体のGenotyping



## HMAサンプル準備のポイント

PCR産物の大きさは100bpから300bp

PCRのサイクル数は多め（30サイクル＜）

効率良くヘテロ二本鎖を形成させるためには、PCR産物の増幅がプラトーに達していた方が良い

PCR反応後

「95°C 5min→0.1°C/secの温度速度で8°Cまで徐冷」

→ヘテロ二本鎖を形成

23

## ゲノムに導入した変異の検出方法

まずは標的部周辺をPCRにより増幅する。 ➡ 配列分析するのが確実

### Cel I アッセイ

（遺伝子変異によるヘテロデュプレックスDNAのミスマッチを認識して切断する酵素）

### HMA

（Heteroduplex Mobility Assay、ヘテロ二重鎖移動度解析）

### RFLP

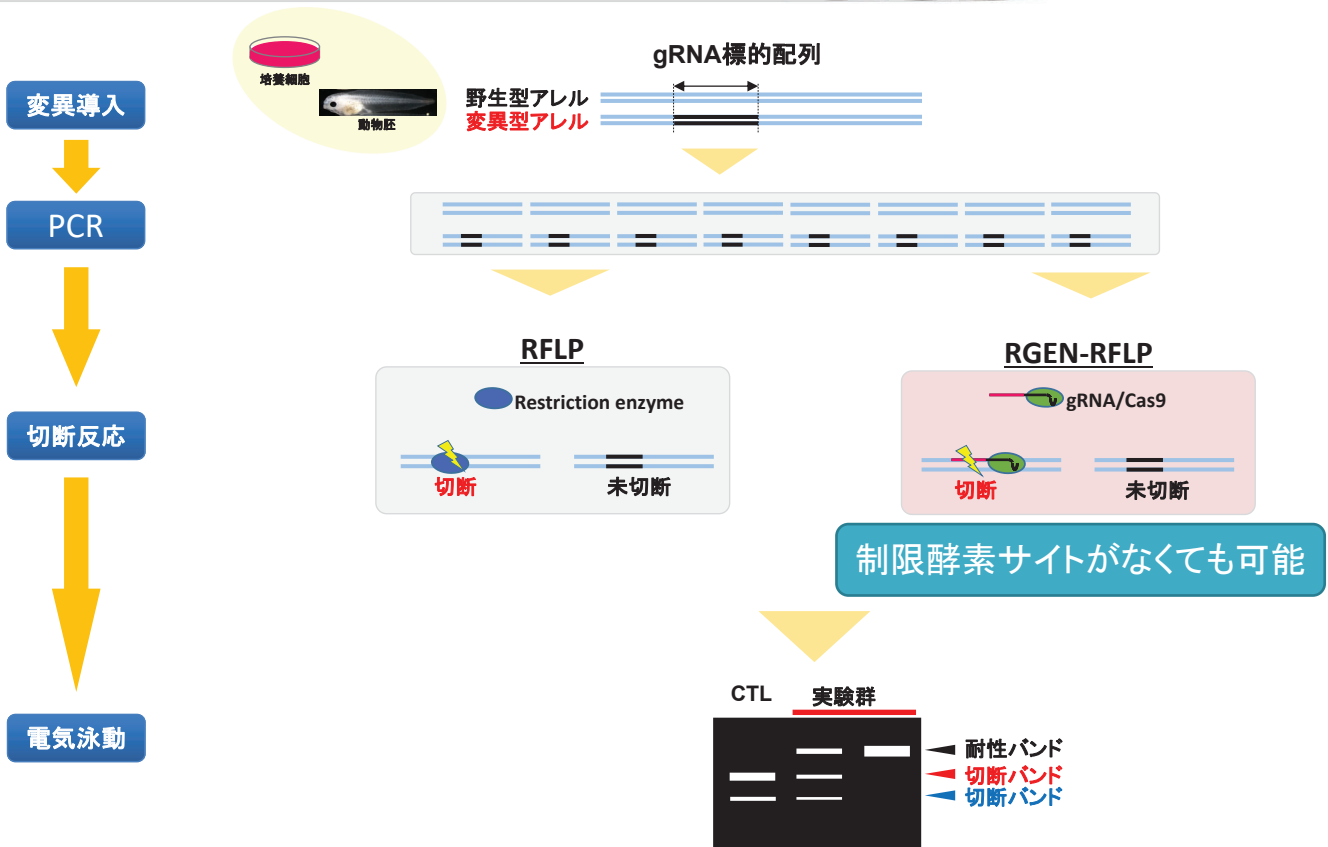
（Restriction Fragment Length Polymorphism、制限酵素断片長多型）

### RGEN-RFLP

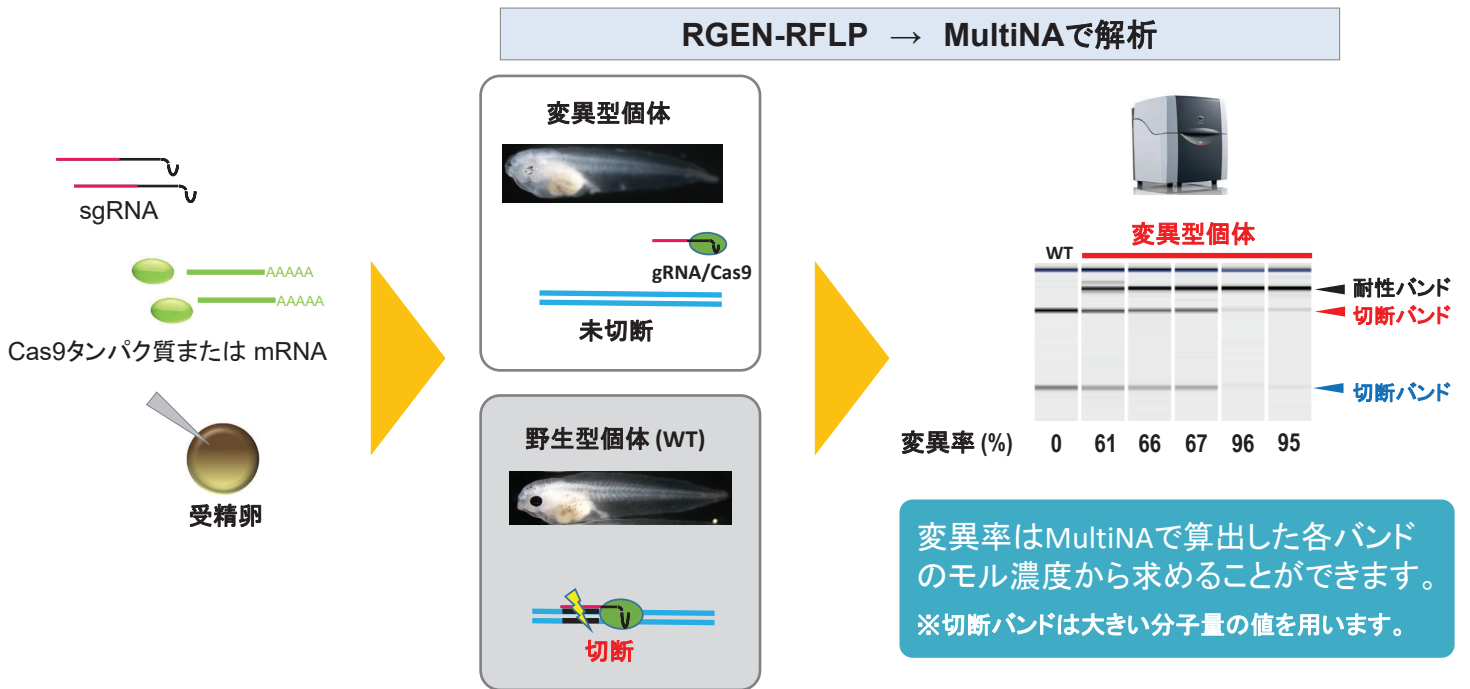
（RNA Guided Endonuclease Restriction Fragment Length Polymorphism、RNA誘導型ヌクレアーゼ制限酵素断片長多型）

24

# (RGEN-)RFLP法によるオンターゲット解析



# MultiNAを利用した (RGEN-)RFLP法によるオンターゲット解析



$$\text{変異率 (\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{切断バンド}}{\text{耐性バンド} + \text{切断バンド}} \right] \times 100$$

## MCE-202 MultiNAアプリケーション紹介

# 次世代シーケンサー： ライブラリー Quality Controlへの応用



## NGSライブラリーの前処理

### ●NGSライブラリ(サンプル)の調製フロー



ここでシーケンシングするか最終確認する。

- 断片化DNA集合体の鎖長分布(スミア)  
→ 1リードの長さに影響
- 断片化DNAのトータル濃度  
→ リード量に影響

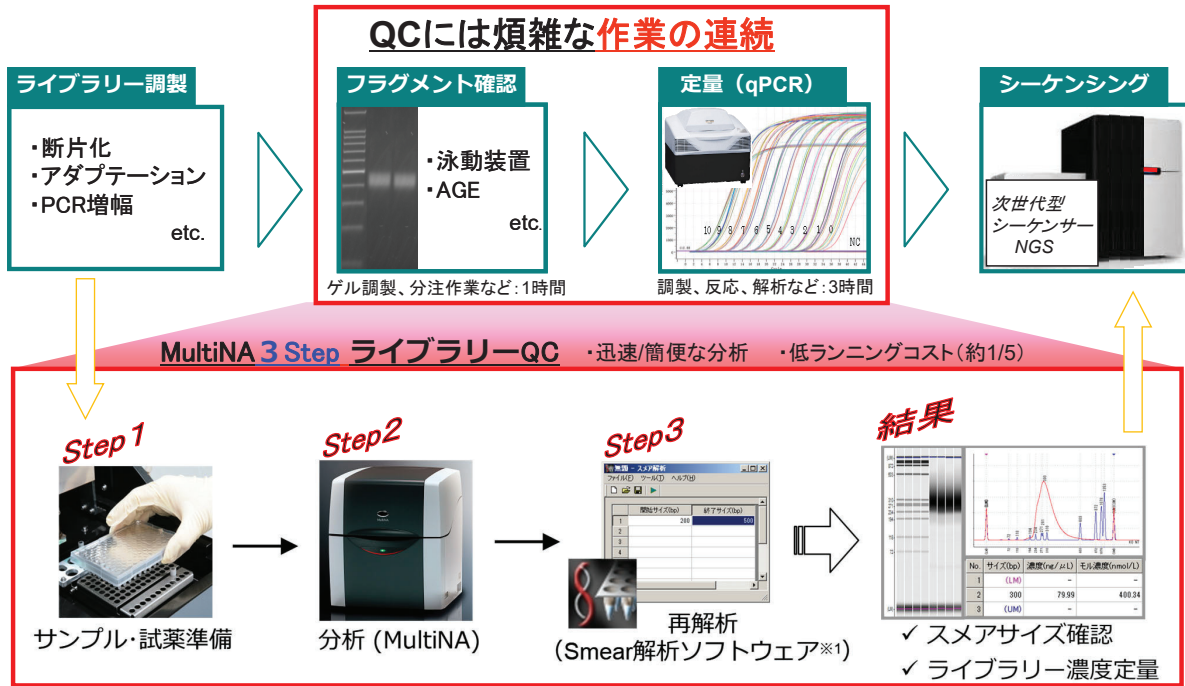
シーケンシング結果に大きく影響するためQCは重要！

具体的には以下の方法でQCを行う。

- ・鎖長分布 ⇒ 電気泳動装置
- ・DNA濃度 ⇒ リアルタイムPCR、蛍光光度計

# MultiNAのNGS-QC応用

## シーケンシングフロー



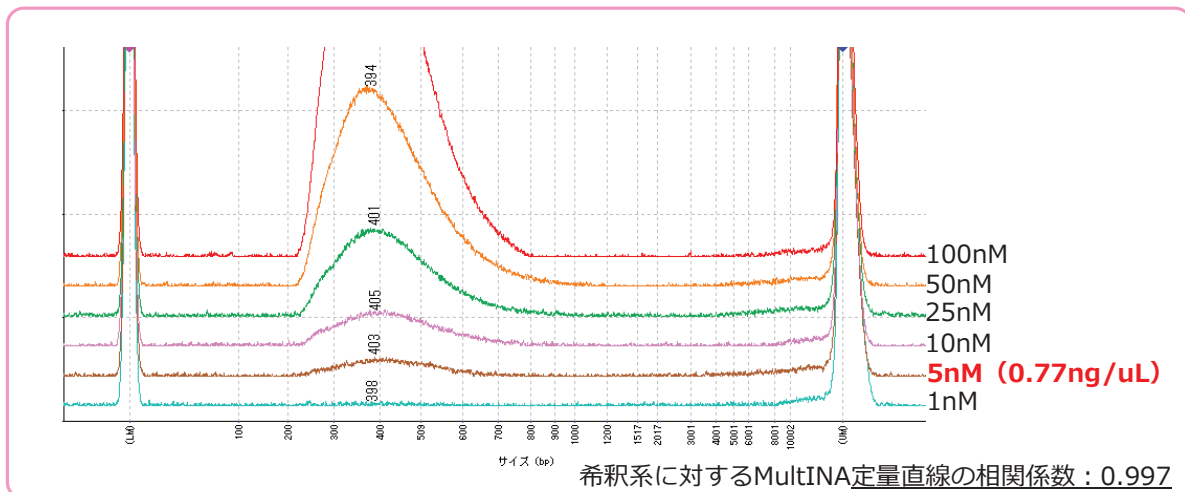
★MultiNAソフトウェアVer1.12は、新たに**スメア解析ソフトウェアを含む**。

# MultiNA : NGSライブラリーQuality Check③

## ●NGSライブラリーに対する検出感度

### ▶ ライブラリー調製

- ・ヒト血液からアジレント社 : SureSelectにてエクソームライブラリーを調製。
- ・日本ジェネティクス社 : KAPA NGSライブラリー定量キットにて定量されたライブラリーを1nM~100nMの濃度希釈系をMultiNAで分析



200~800bp程度のサイズ分布に対し、5nM程度なら検出可能

※ライブラリーの分布状況に検出感度は依存します。

# MultiNA : その他の用途



MultiNAは「ゲノム編集」の専用装置ではありません。

## 【主なその他の用途】

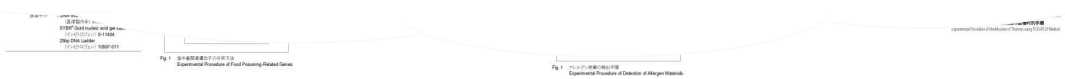
- Genotyping (病原体、食物、アレルゲン...etc.)
- PCR産物のサイズ確認

DNA/RNAサイジング・簡易定量装置として  
**稼働率高く、汎用的に利用**できます。

# アプリケーションニュース

<p><b>SHIMADZU APPLICATION NEWS</b>        ●マイクロチップ電気泳動法        Microchip Electrophoresis No.B32</p> <p>MCE-202 "MultiNA" を用いたRAPD-STS法による        白いんげん豆 (手亡豆) の品種判別        Identification of Common Bean Cultivars by RAPD-STS with MCE-202 "MultiNA"</p>	<p><b>SHIMADZU APPLICATION NEWS</b>        ●マイクロチップ電気泳動法        Microchip Electrophoresis No.B27</p> <p>MCE-202 "MultiNA" によるカビ・酵母遺伝子の検出        Detection of Molds and Yeast Gene with MCE-202 "MultiNA"</p>	<p><b>SHIMADZU APPLICATION NEWS</b>        ●マイクロチップ電気泳動法        Microchip Electrophoresis No.B30</p> <p>MCE-202 "MultiNA" を用いたマルチプレックスPCR法        によるコメの品種判別        Identification of Rice Varieties by Multiplex PCR with MCE-202 "MultiNA"</p>
<p><b>SHIMADZU APPLICATION NEWS</b>        ●マイクロチップ電気泳動法        Microchip Electrophoresis No.B37</p> <p>MCE-202 "MultiNA" を用いたトモロコシ加工食品中        の組換え遺伝子の定性分析        Qualitative Analysis of Recombinant Gene in Corn Processed Food        with MCE-202 "MultiNA"</p>	<p><b>SHIMADZU APPLICATION NEWS</b>        ●マイクロチップ電気泳動法        Microchip Electrophoresis No.B26</p> <p>糞便直接RT-PCR法によるノロウイルスG1&amp;G2遺伝子増殖産物の検出        Detection of Norovirus G1 &amp; G2 Genes in Stool Using Direct RT-PCR Method</p>	<p><b>SHIMADZU APPLICATION NEWS</b>        ●マイクロチップ電気泳動法        Microchip Electrophoresis No.B29</p> <p>MCE-202 "MultiNA" を用いた標準分析法による遺伝子組換えトモロコシの定性分析        Qualitative Analysis of Genetically Modified Corn by Standard Method with MCE-202 "MultiNA"</p>
<p><b>SHIMADZU APPLICATION NEWS</b>        ●マイクロチップ電気泳動法        Microchip Electrophoresis No.B22</p> <p>MCE-202 "MultiNA" による食中毒関連遺伝子の解析        Detection of Food Poisoning-Related Genes with MCE-202 "MultiNA"</p>	<p><b>SHIMADZU APPLICATION NEWS</b>        ●マイクロチップ電気泳動法        Microchip Electrophoresis No.B23</p> <p>MCE-202 "MultiNA" によるアレルゲン物質の検出        Detection of Allergen Materials with MCE-202 "MultiNA"</p>	<p><b>SHIMADZU APPLICATION NEWS</b>        ●マイクロチップ電気泳動法        Microchip Electrophoresis No.B28</p> <p>MCE-202 "MultiNA" 用いたPCR-RFLP法によるマグロ属魚類の品種判別        Identification of Thunnus using PCR-RFLP Method with MCE-202 "MultiNA"</p>

さまざまな分析例をアプリケーションニュースとして提供しております。  
 ぜひ参考にしてください。



# アプリケーションノート



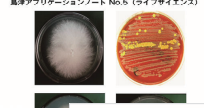
## Application Note



LAMC002



## Application Note



LAMC003

LAMC004



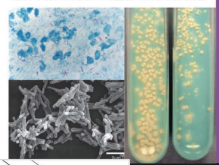
## Application Note



LAMC005



## Application Note



LAMC006

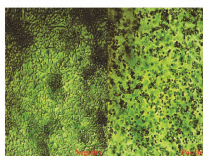
LAMC007

### 1. アレキシーとは

魚の体に感染するアレキシーは、主に淡水魚の稚魚に感染し、魚体表面に赤い斑を形成し、最終的に死に至ります。本アプリケーションノートでは、アレキシーの検出と同定にMultinaが活用されています。

1. はじめに

## Application Note



微量な病原体遺伝子の検出・同定  
— Multina の活用 —

著者 船山 T. FUKUMOTO 著者 有田 Y. YOSHIDA

### 1. はじめに

感染性細菌、ウイルス、真菌、寄生虫などの体内に侵入することで、さまざまな病状を引き起こす病原体の検出・同定は、医療・食品・環境衛生などの分野で重要な役割を果たしています。本アプリケーションノートでは、微量な病原体遺伝子の検出・同定にMultinaが活用されています。

サトウキビの病原体遺伝子の検出・同定にMultinaが活用されています。本アプリケーションノートでは、微量な病原体遺伝子の検出・同定にMultinaが活用されています。

\*1 遺伝子増幅試薬、増幅産物検出システム、増幅産物検出システム

## Application Note



No. 31  
ライファイアンス

### 1. はじめに

多量なDNAサンプルを短時間で検出・同定するためのアプリケーションノートです。本アプリケーションノートでは、微量なDNAサンプルの検出・同定にMultinaが活用されています。

## Application Note



メダカへの変異導入と変異系統作製  
— Application of Multina —

### 1. はじめに

メダカへの変異導入と変異系統作製にMultinaが活用されています。本アプリケーションノートでは、微量なDNAサンプルの検出・同定にMultinaが活用されています。

## Application Note



No. 36  
ライファイアンス

### 1. はじめに

メダカへの変異導入と変異系統作製にMultinaが活用されています。本アプリケーションノートでは、微量なDNAサンプルの検出・同定にMultinaが活用されています。



# 遺伝子増幅試薬 Ampdirect®

## DNA精製不要のPCR



# 関連製品：検体直接PCR技術 - Ampdirect®

血液・ろ紙血 口腔粘膜細胞 尻尾 培養細胞 植物 微生物 昆虫 パラフィン切片

**通常のPCRバッファー**

● ▲ 血液中の反応阻害因子

伸張反応阻害

酵素活性阻害

**ゲノムDNA精製が必要！**

gDNA精製法

約30分

キアゲン社 QIAamp® DNA Blood Mini Kit

分注溶解液 20μL	分注血液 200μL	分注溶解液① 200μL	静置 10分 56℃	分注溶解液② 200μL	移液	吸着 速心 1分	分注溶解液③ 500μL	洗浄 速心 1分	分注溶解液④ 500μL	洗浄 速心 3分	排除 速心 1分	分注溶解液⑤ 200μL	静置 室温 1分	溶出 速心 1分
		混合 15秒		混合 15秒										

検体直接PCR

**Ampdirect®バッファー**


● ▲ 血液中の反応阻害因子

○ 阻害因子の中和成分

**DNA精製不要のPCR**

遺伝子増幅試薬

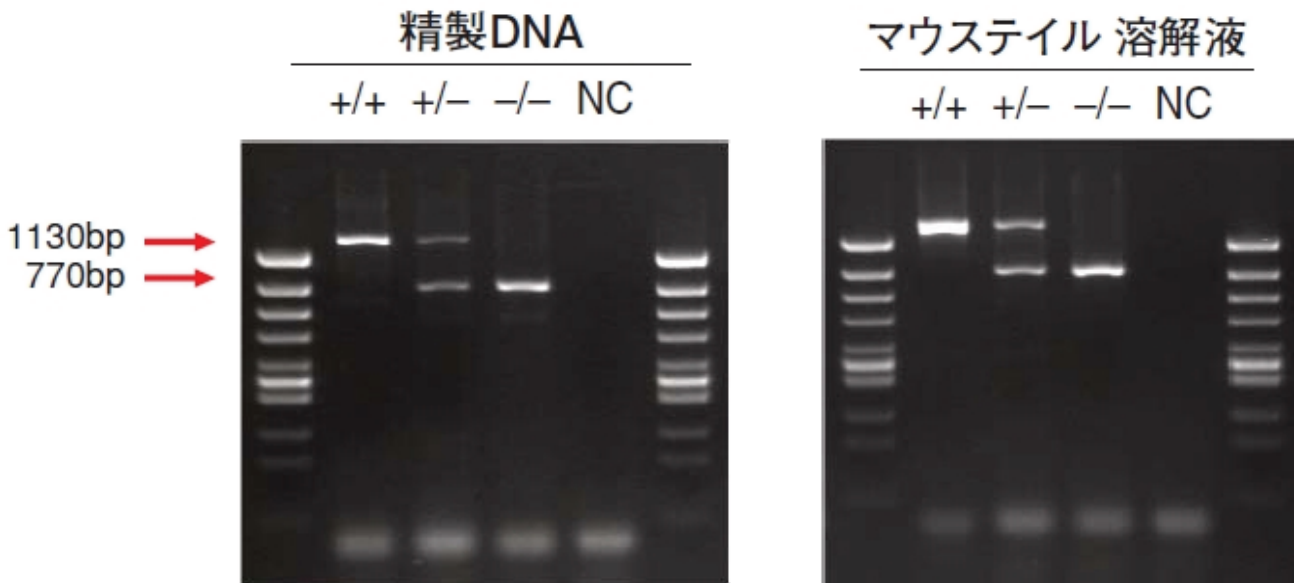
**Ampdirect®**



注) 検体によっては溶解液での熱処理を実施してください。

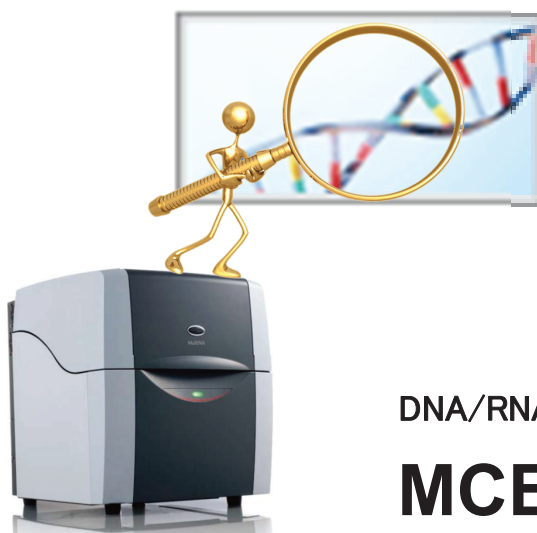
# 簡便マウスジェノタイピング実施例

●「精製DNAを用いた反応」と「マウステイル直接反応」との比較



➡ DNA精製が不要となり、迅速・低コストなジェノタイピングが可能。

ご清聴ありがとうございました。  
今後とも、島津製作所を宜しくお願い致します。



DNA/RNA分析用マイクロチップ電気泳動装置

**MCE202 "MultiNA"**