

～全自動電気泳動装置 MultiNA のご紹介～



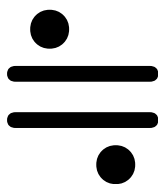
(株)島津製作所 分析計測事業部

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)

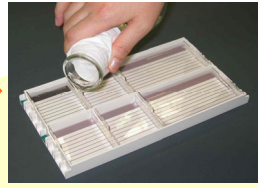
の不満を解消します



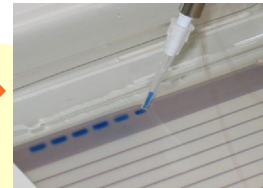
試薬の秤量



アガロースの溶解



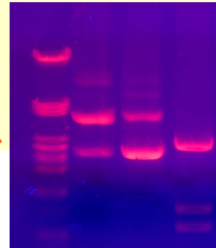
溶液の流し込み



サンプルアプライ



電気泳動開始



EtBrによる染色



写真撮影

器具の洗浄

(; `) トホホ

- ・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

3

アガロースゲル電気泳動の不満点



“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られない

4

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！

5

MultiNAシステムの構成

装置の構成



PC(装置制御、結果閲覧)

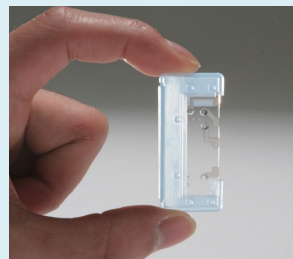
洗浄水

装置本体

・オートサンプラーが内蔵されているため
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!

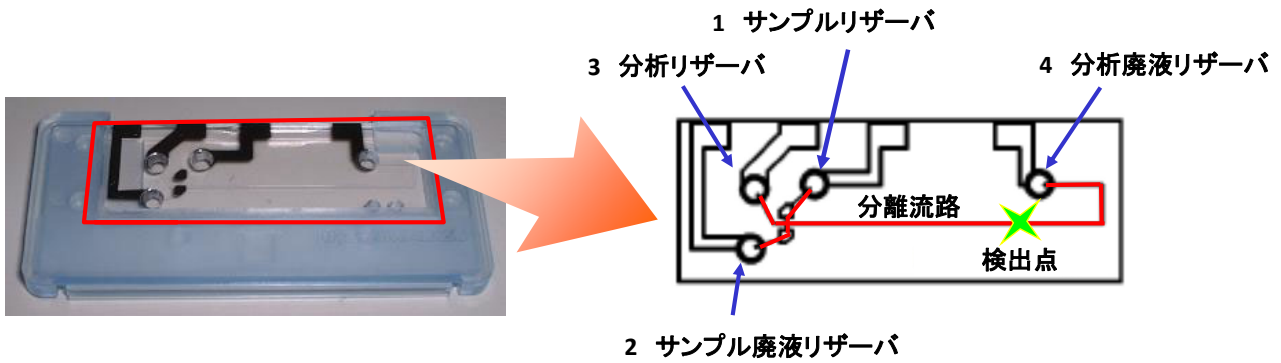
●試薬キット (DNA用4種類、RNA用1種類)



- DNA-500 (25～500bp)
- DNA-1000 (100～1000bp)
- DNA-2500 (100～2500bp)
- DNA12000 (100～12000bp)
- RNA (28SrRNA:5000ntまで)

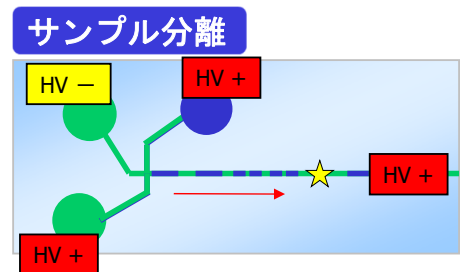
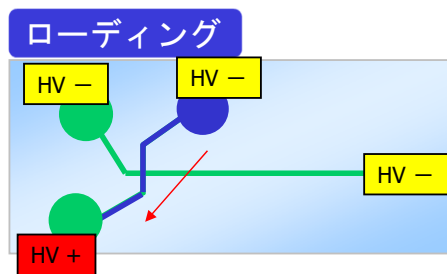
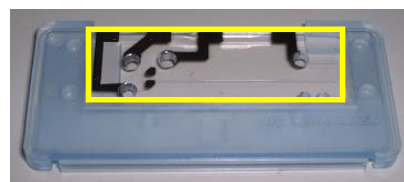
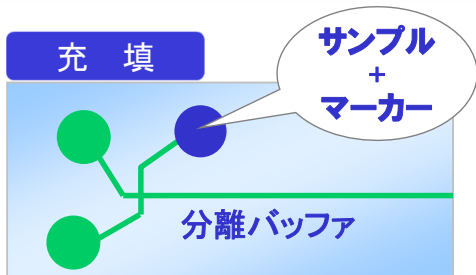
6

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

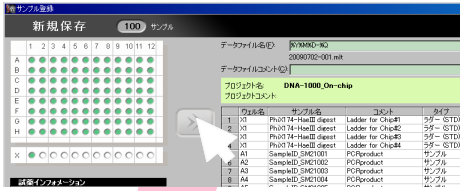
マイクロチップ電気泳動の原理



操作は簡単3ステップ

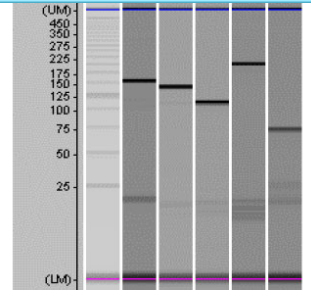
Point! 検体数が多くても、手間は変わらず簡単!

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



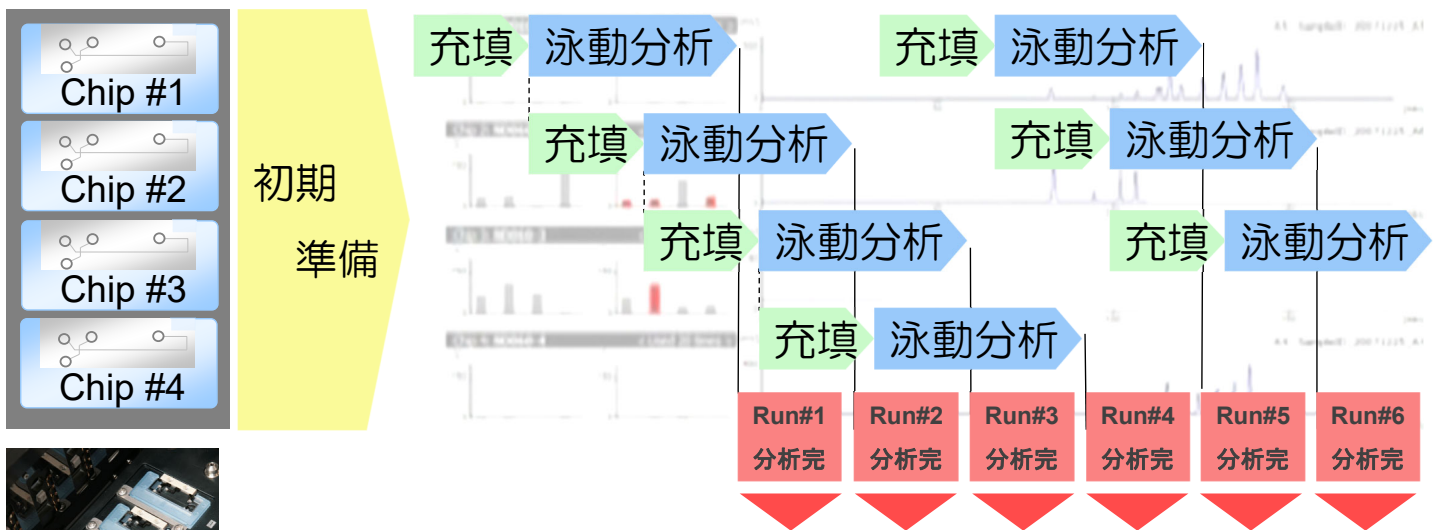
- ・PCRチューブや96wellプレートのまま
1~108サンプルまでセット。
- ・試薬を必要量だけ分注、無駄が無い!
- ▶ **ゲルの作成は一切不要**です。

③ 分析の開始



スタートボタンを
クリック!

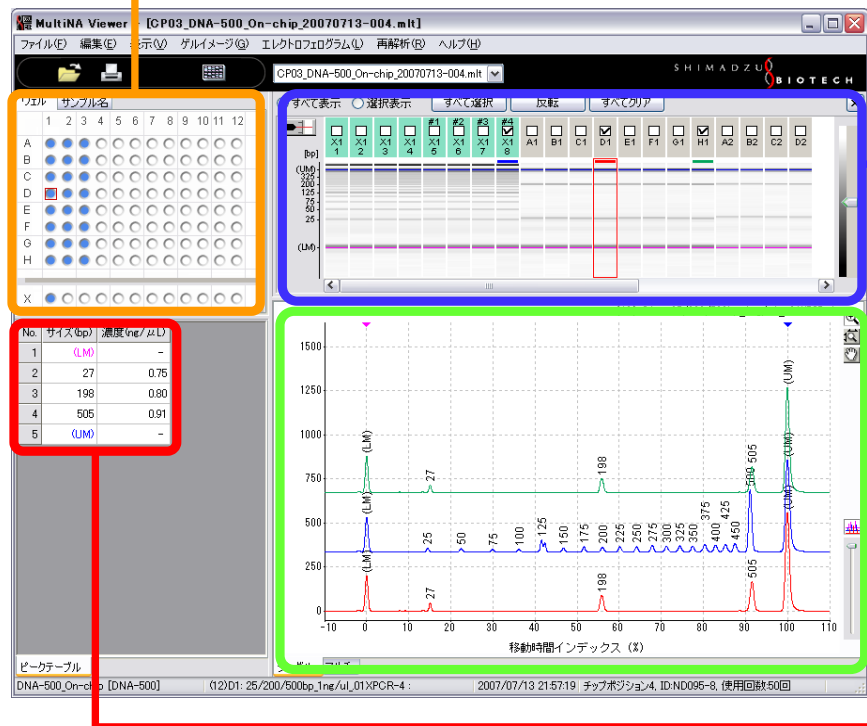
MultiNAの自動分析の流れ



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

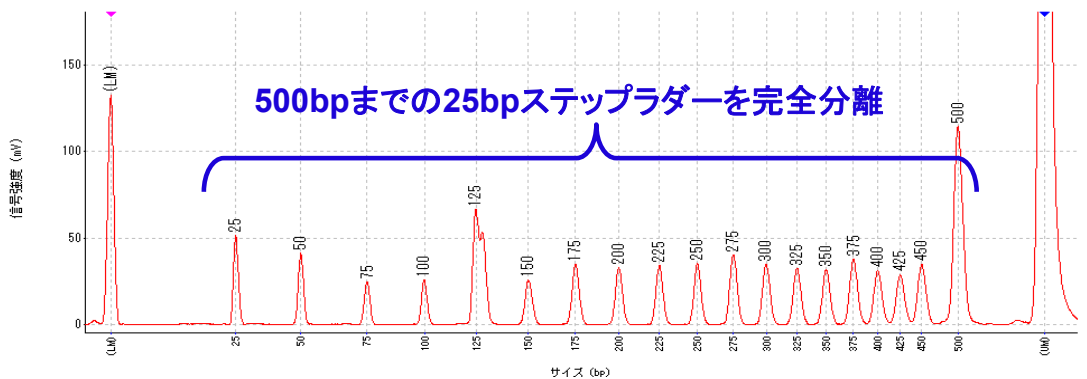
- ⇒各DNAフラグメントのサイズ推定値や濃度を自動算出。

11

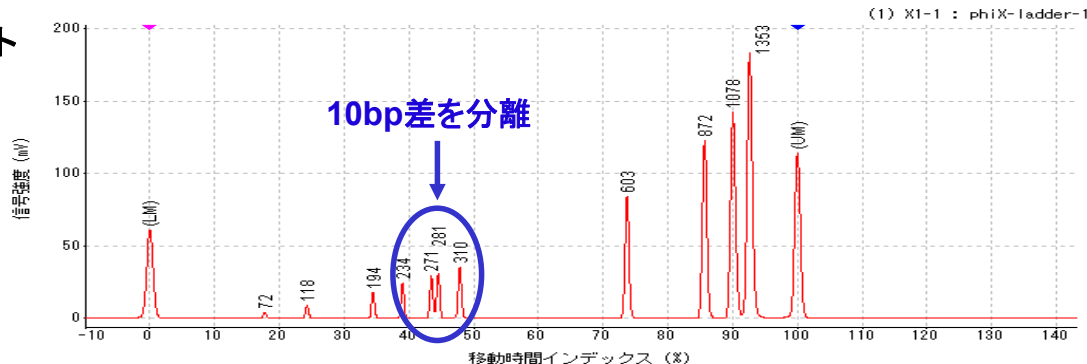
分析性能① 高い分離能

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



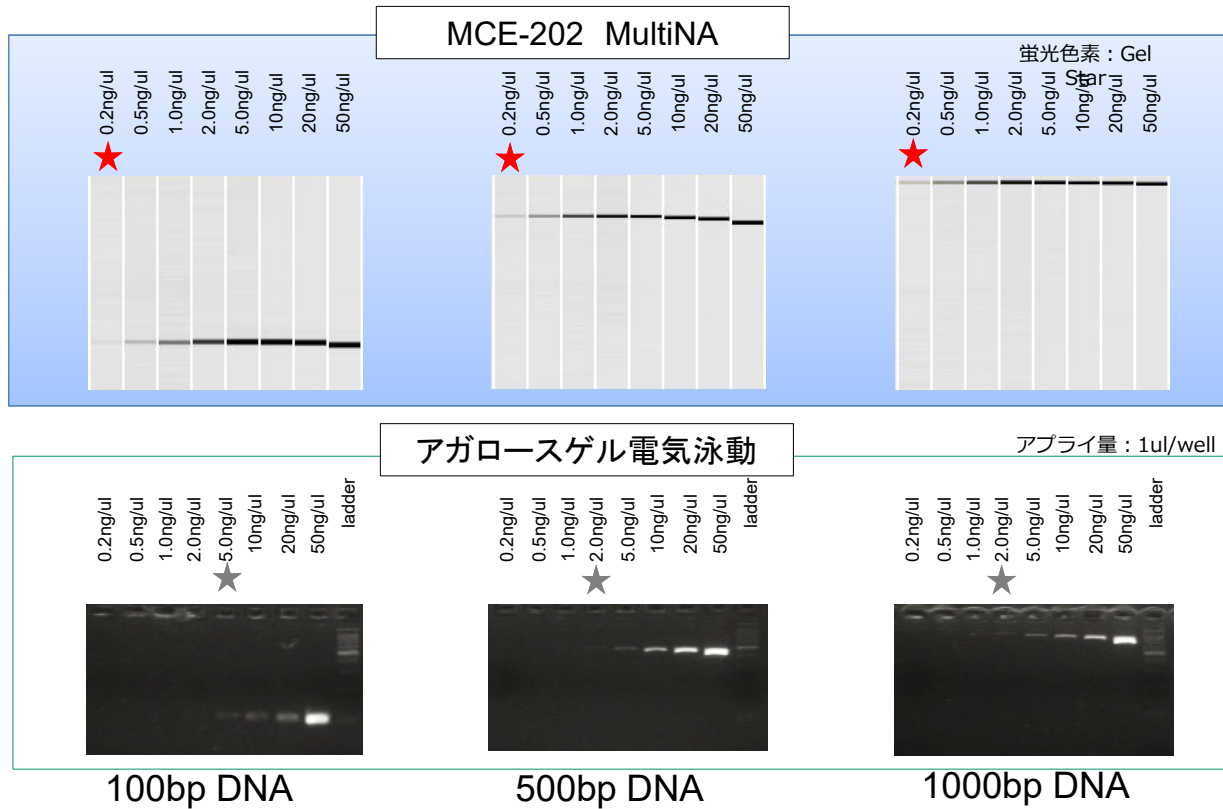
●DNA-1000キット



12

分析性能② 高感度検出

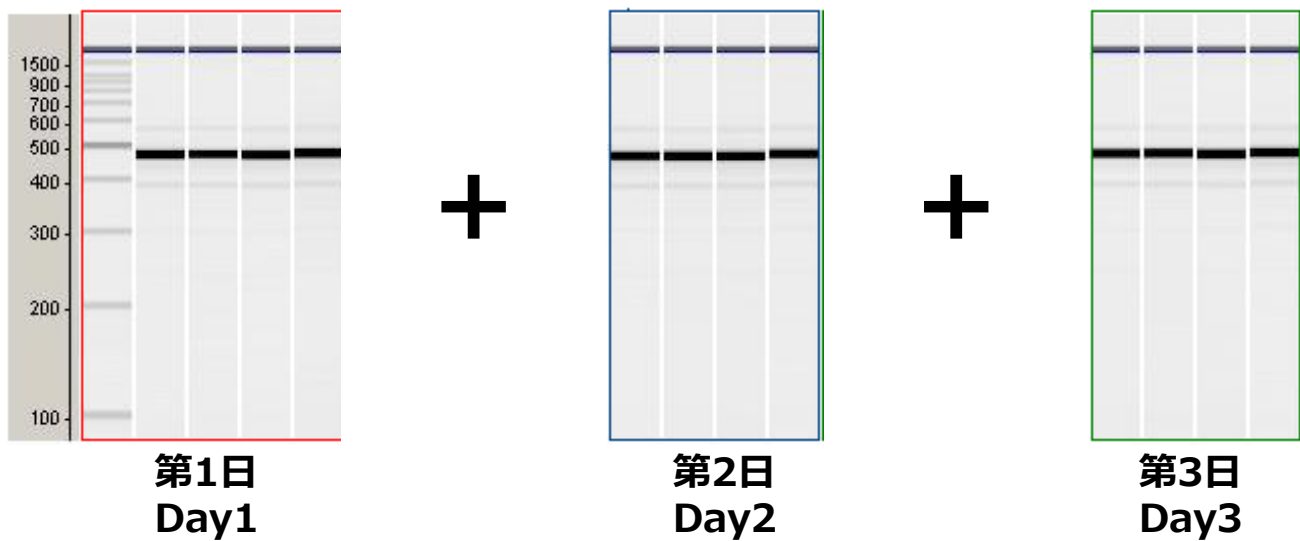
MultiNAはアガロースゲル電気泳動に比べて**一桁以上高感度**です。



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。



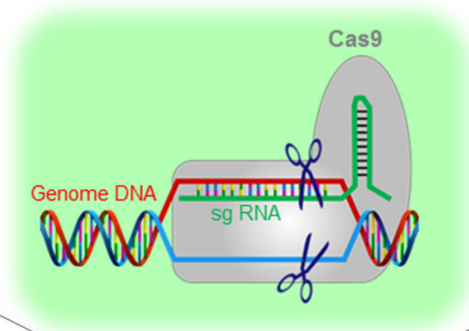
- ・ サンプルの順番を変えたい場合
- ・ 別の日に分析したデータと比較したい場合



便利です

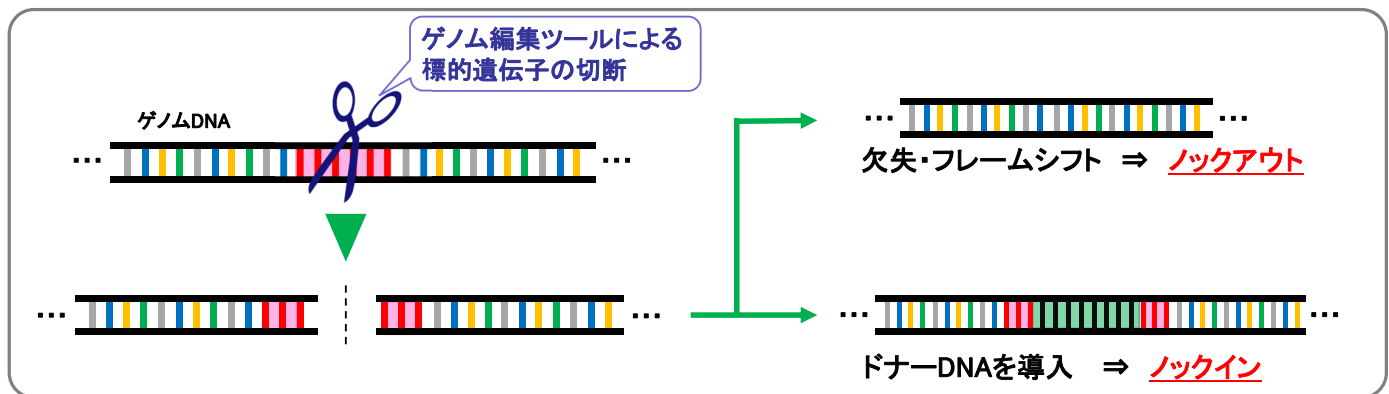
MultiNA アプリケーション紹介

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

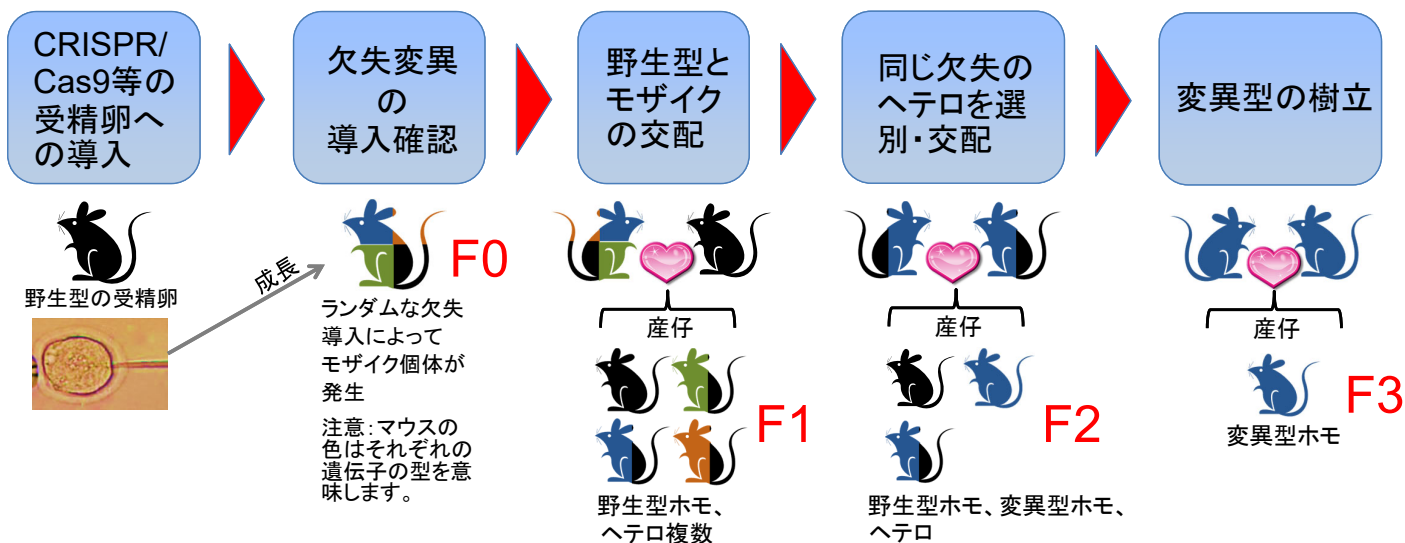
TALEN

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

まずは標的部局周辺をPCRにより増幅 ➡ 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 → 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

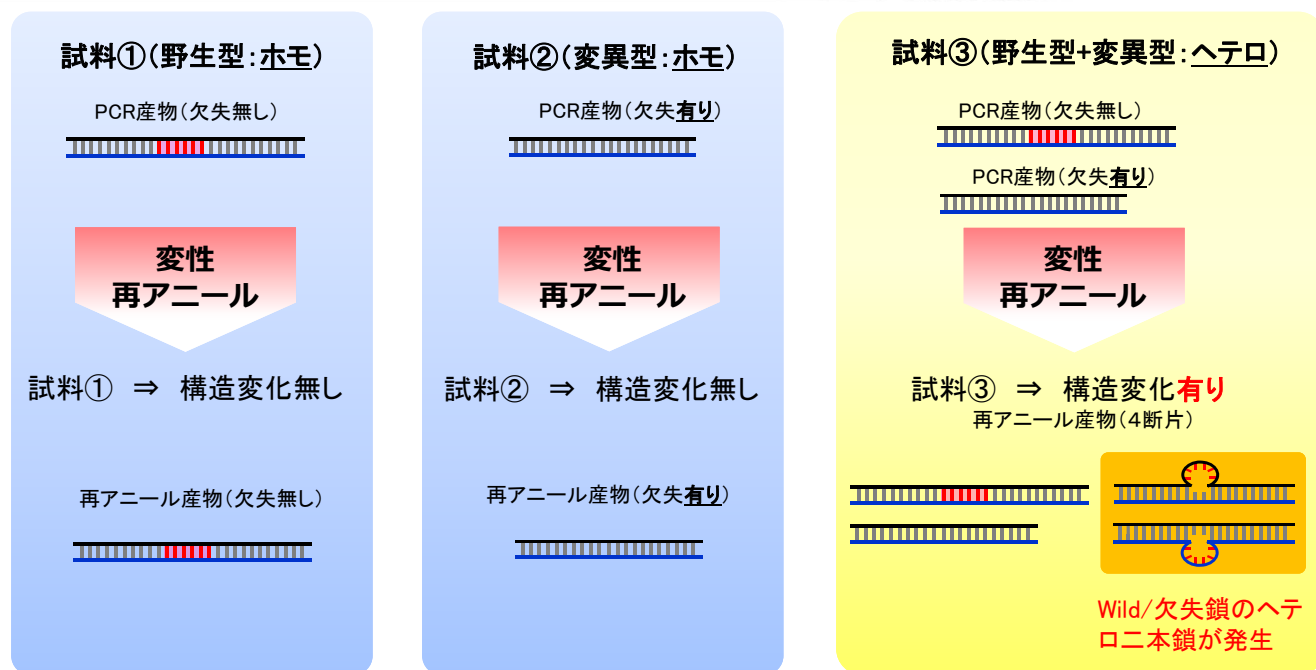
(Restriction Fragment Length Polymorphism、制限酵素断片長多型)

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



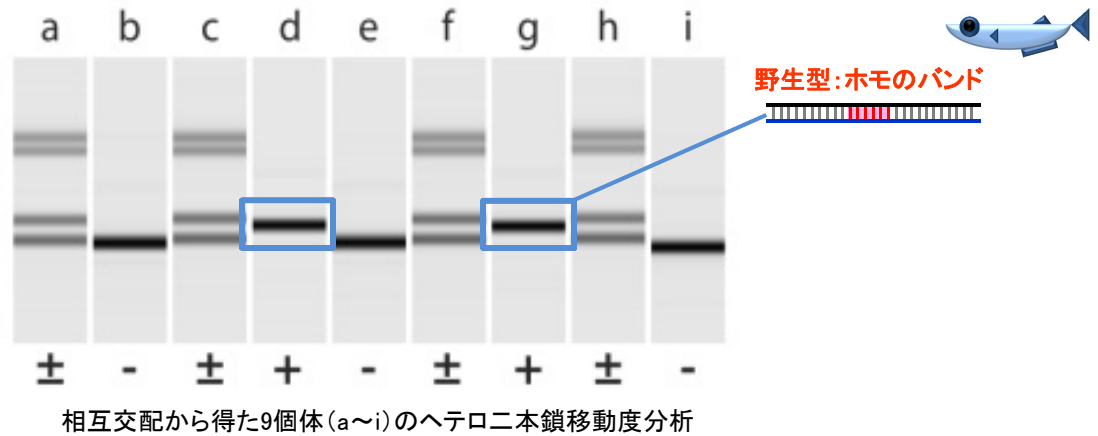
全自動電気泳動装置
MCE-202 MultiNA

20

ヘテロ二重鎖移動度分析 (HMA) 法とMultiNA

MultiNAでの分析例

ゲノム編集された変異(8bp欠失)を有するメダカ(ヘテロ)の交配を行い、産出個体に対する欠失近傍領域のPCRを実施し、MultiNAでヘテロ二本鎖移動度分析を実施。

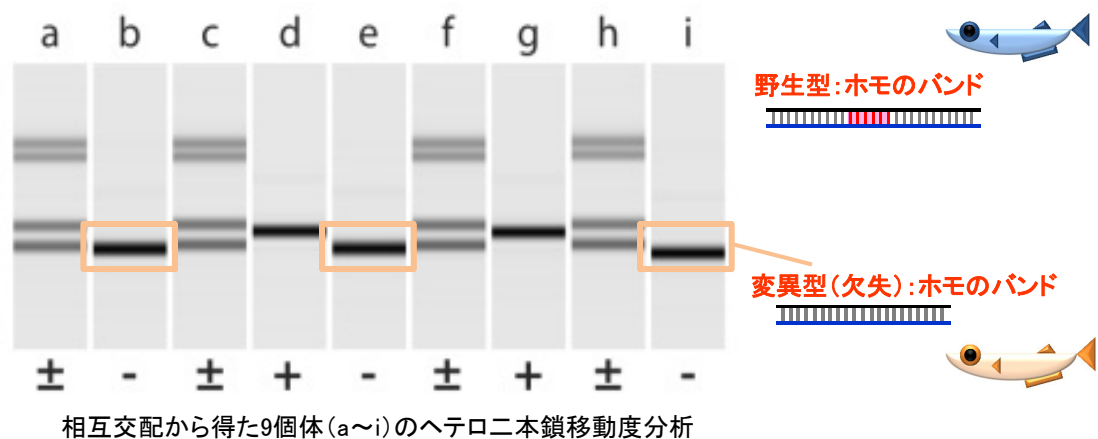


21

ヘテロ二重鎖移動度分析 (HMA) 法とMultiNA

MultiNAでの分析例

ゲノム編集された変異(8bp欠失)を有するメダカ(ヘテロ)の交配を行い、産出個体に対する欠失近傍領域のPCRを実施し、MultiNAでヘテロ二本鎖移動度分析を実施。

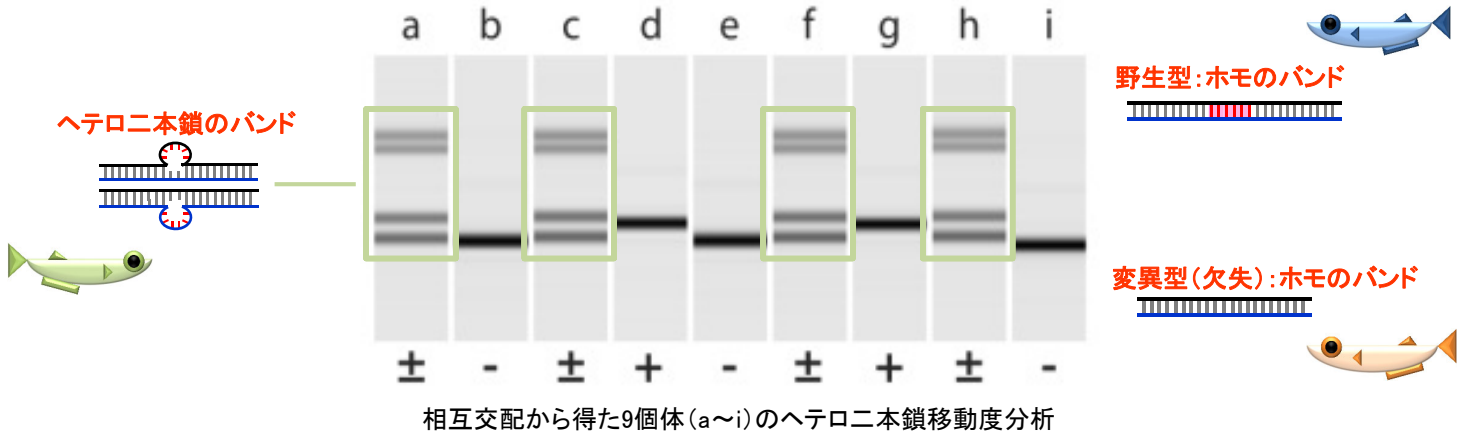


22

ヘテロ二重鎖移動度分析 (HMA) 法とMultiNA

MultiNAでの分析例

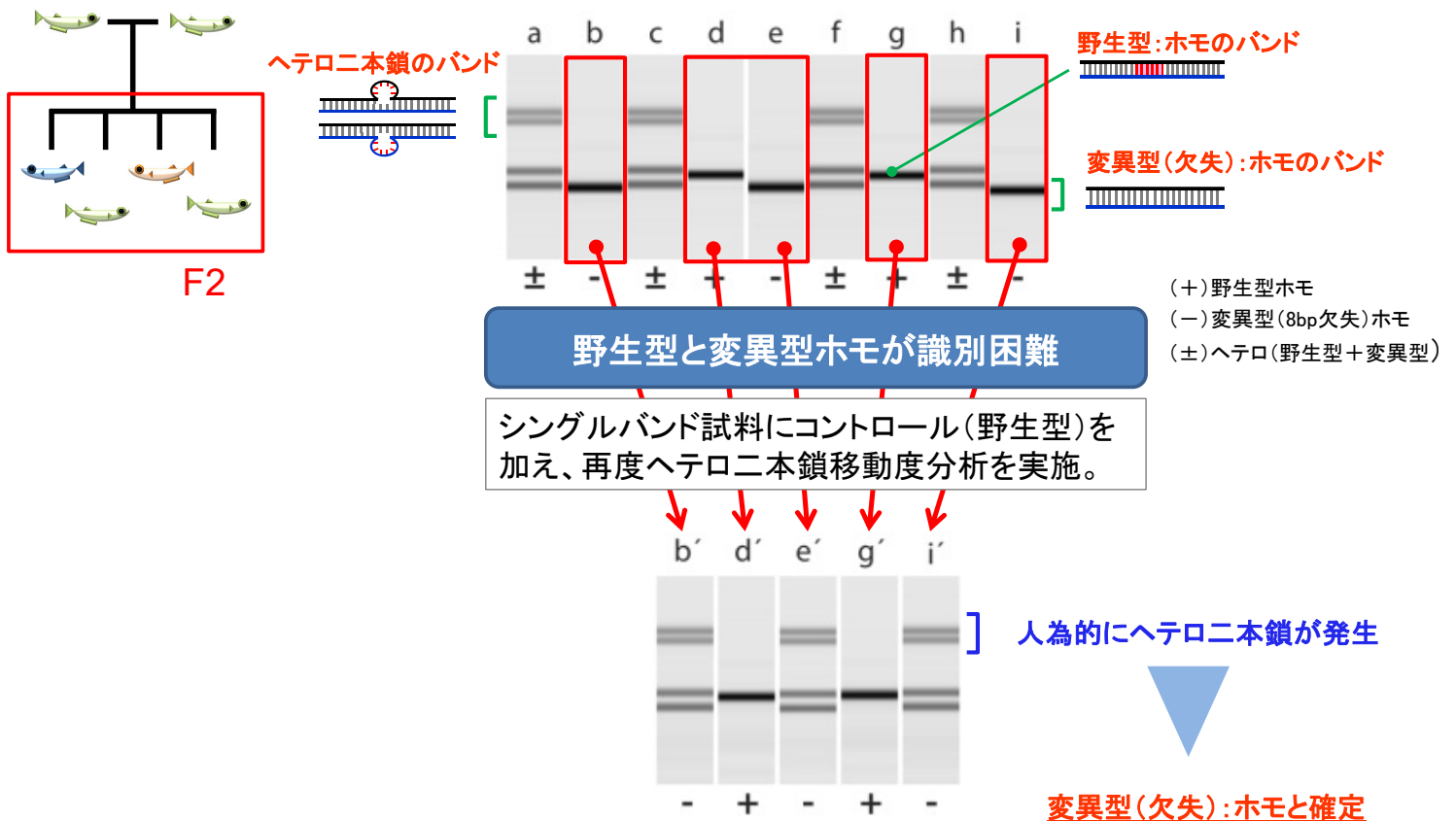
ゲノム編集された変異(8bp欠失)を有するメダカ(ヘテロ)の交配を行い、産出個体に対する欠失近傍領域のPCRを実施し、MultiNAでヘテロ二本鎖移動度分析を実施。



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サイクル以上）

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よい

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

25

HMA法のメリットとデメリット

メリット

- 効率的で簡便、低コストに実施可能

デメリット

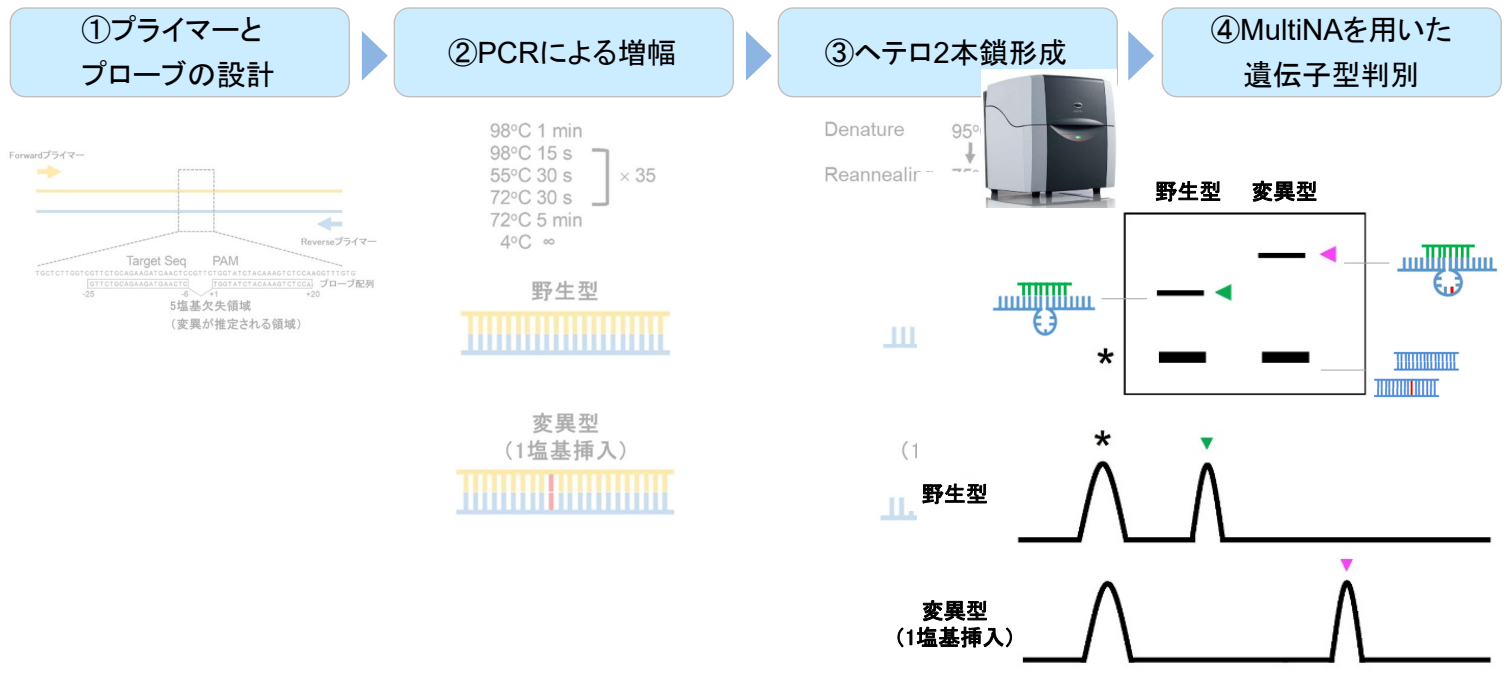
- DNAの1塩基の挿入・欠失を判別することが困難

1塩基鎖の判別を可能にした新手法・PRIMA法をご紹介します

26

PRIMA法とは？

PRIMA法 (Probe-induced Heteroduplex Mobility Assay)
5塩基欠損をもつ40塩基のプロープを用いて、1塩基違いを検出する手法



PRIMA法のメリット

ホモ・ヘテロ固体の1ステップ解析による遺伝子型判別

従来のHMA法

1回目の解析

サンプルのみでHMA → ヘテロ2本鎖シグナルあり ⇒ **ヘテロ接合型**
 → ヘテロ2本鎖シグナルなし ⇒ **野生ホモ型** もしくは **変異ホモ型**

2回目の解析

サンプル+野生型でHMA → ヘテロ2本鎖シグナルあり ⇒ **変異ホモ型**
 → ヘテロ2本鎖シグナルなし ⇒ **野生ホモ型**

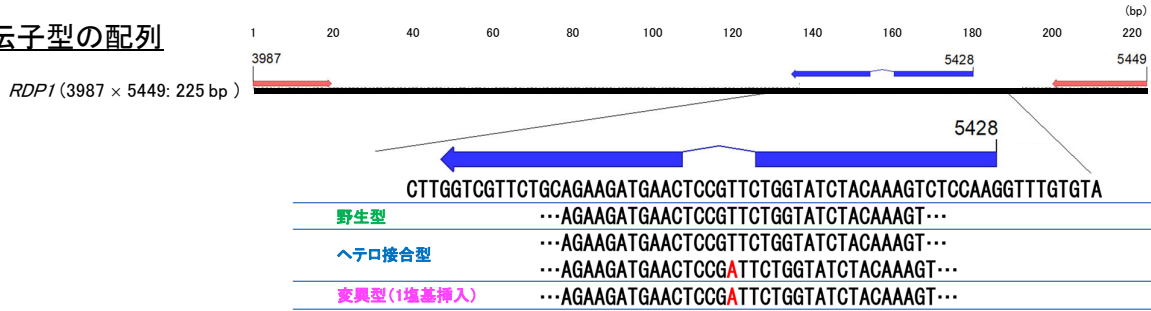
PRIMA法

サンプル+プローブで解析 → 野生型のシグナル ⇒ **野生ホモ型**
 → 野生型と変異型両方のシグナル ⇒ **ヘテロ接合型**
 → 変異型のシグナル ⇒ **変異ホモ型**

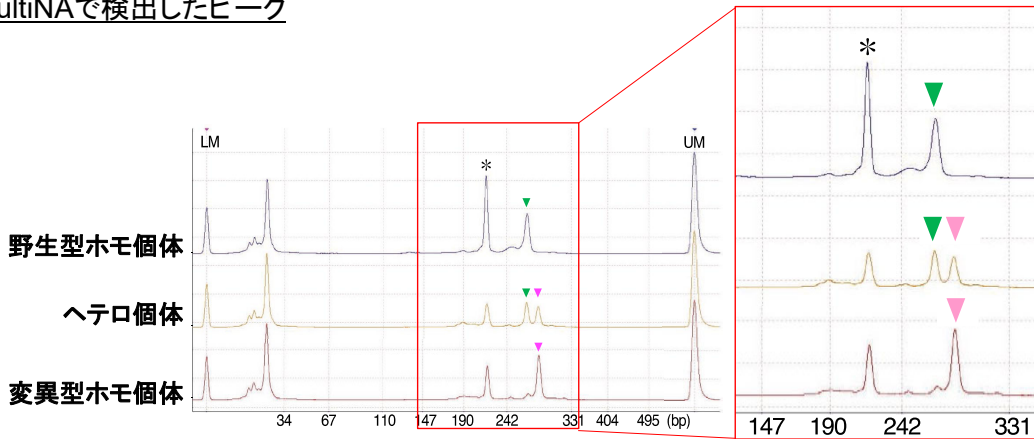
ホモ・ヘテロ個体の遺伝子型判別

シロイヌナズナのRDP1遺伝子に1塩基挿入し、PRIMA法で解析した例

各遺伝子型の配列



MultiNAで検出したピーク



野生型と変異型のピークが
1回の解析で検出可能

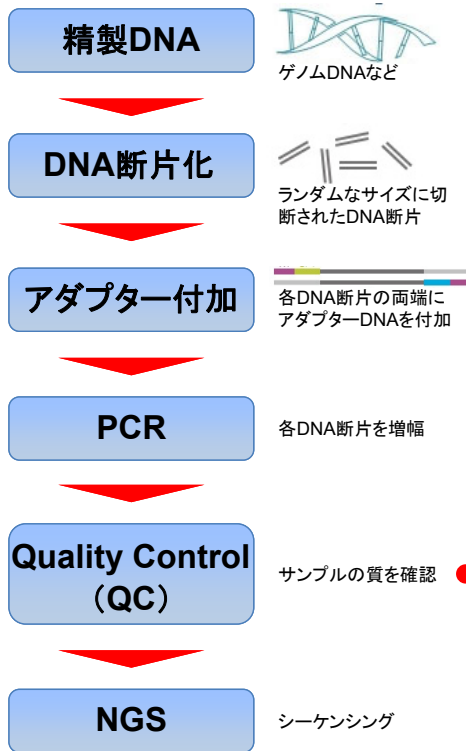
MCE-202 MultiNAアプリケーション紹介

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(スメア)
 - 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

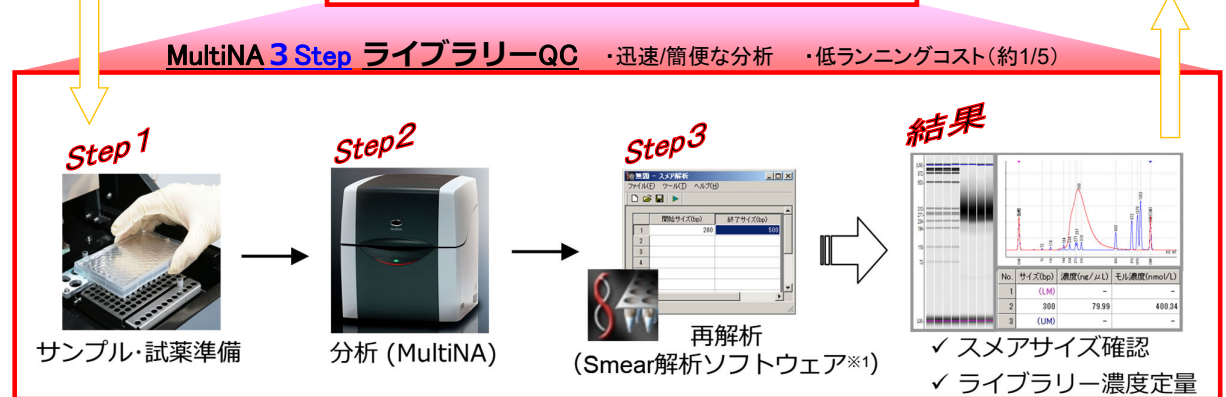
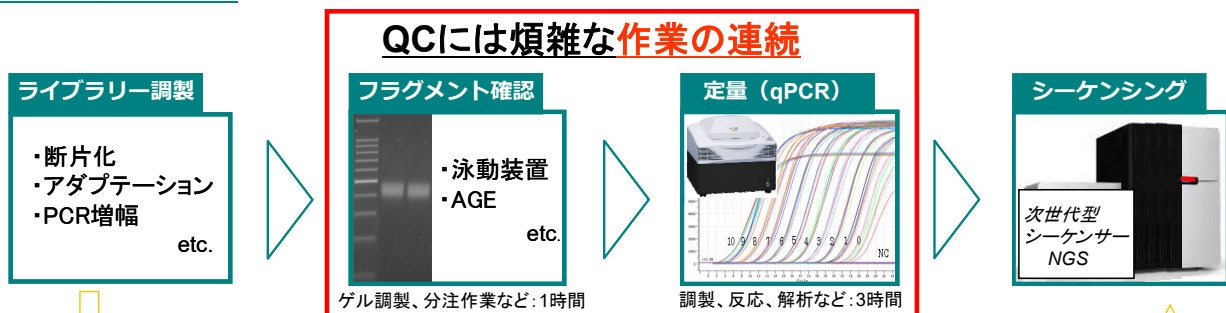
シーケンシング結果に大きく影響するためQCは重要！

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



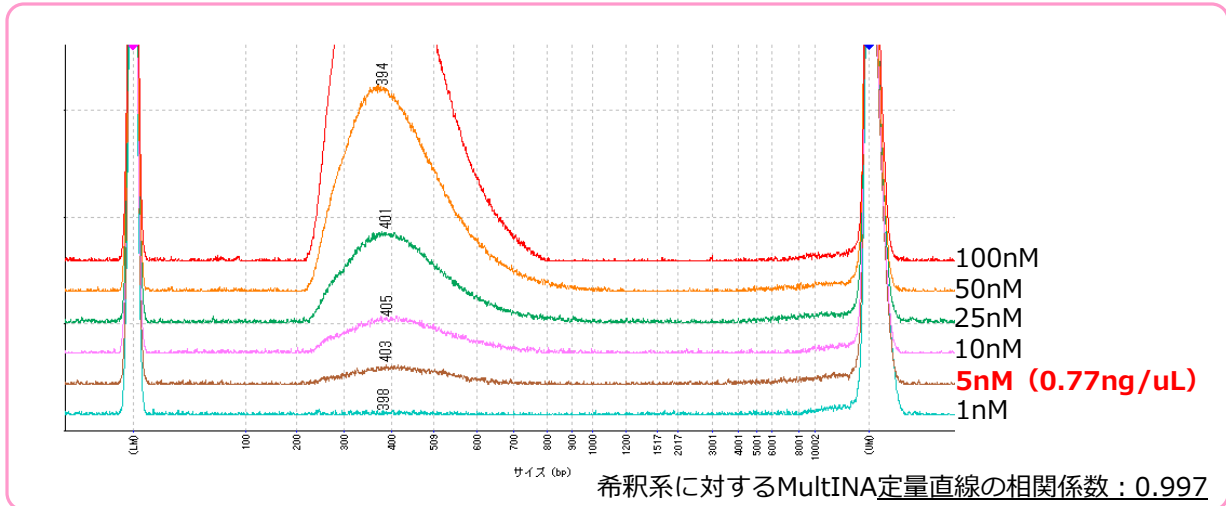
★MultiNAソフトウェアVer1.12は、新たにスメア解析ソフトウェアを含む。

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。

35

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。

36

