

〔原 著〕

Single strand conformation polymorphism (SSCP)

パターンに及ぼす泳動条件の影響

前川真人*・須藤加代子**・Dilip Chandra Dey*・小谷一夫*・菅野剛史*

SUMMARY

We investigated the effects of electrophoretic gels, buffers or temperature on SSCP pattern by an automated electrophoretic system, Phast System. The electrophoresis on the 12.5% homogeneous gel gave the greatest difference in the mobility shift by genetic mutation. The SDS-containing buffer increased the resolution of each band as well as the sensitivity of detection in most cases. However, for certain mutated sequences, the native buffer was superior at detecting mutations. The mobility shift is also temperature dependent irrespective of native or SDS buffer condition. In any new mutation sequences, it is difficult to determine which is the better condition to detect the mutations, SDS or native buffer; however, the SDS-containing buffer may lead to a better sensitivity of detection. In conclusion, it is important to perform SSCP analysis under SDS buffer condition as well as native buffer condition in all cases.

Key words: polymerase chain reaction (PCR), single strand conformation polymorphism (SSCP), genetic mutation, SDS, temperature.

緒 言

遺伝子の変異部位を同定するためには、最終的には塩基配列の決定が必要であるが、単一の遺伝子であってもすべての塩基配列を決定するのは多大な労力を必要とする。そこで、変異のある部位を限定するためのスクリーニング的な手法が有用である。single strand conformation polymorphism (SSCP) 分析¹⁾は、その一つで、簡便性などの利点から現在最も頻用されている手法であり、single strand (ss) DNA の3次構造の変化をとらえようとするものである。われわれも遺伝性変異を検出するためのフローチャートに SSCP 分析によるスクリーニン

グを加えている²⁾。しかし原法¹⁾では放射性同位元素を用いるため、われわれは放射性同位元素を用いず銀染色で検出する方法を考案し、ファルマシア社製の全自動電気泳動装置ファストシステムに適用し、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH; EC. 1.1.1.27) の遺伝子変異をみいだすことに成果を上げている³⁻⁵⁾。しかし SSCP の泳動パターンは対象とする DNA フラグメントの塩基配列に依存はするが、逆に塩基配列からどのような3次構造、泳動パターンをとるかという予測は現時点では不可能である。これは、ssDNA のとりうる3次構造が種々の泳動条件によって変化するためと考えられ、実際、泳動温度、グリセロールの有無などにより泳動パ

Effect of electrophoretic conditions on single strand conformation polymorphism (SSCP) pattern.

* Masato Maekawa, Dilip Chandra Dey, Kazuo Kotani, Takashi Kanno; 浜松医科大学臨床検査医学

** Kayoko Sudo; 東京慈恵会医科大学第三病院臨床検査医学

Correspondence address: Masato Maekawa, Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, Handa-cho 3600, Hamamatsu 431-31, Japan.

(受付 1993年9月13日, 受理 1993年10月18日)

略号: SSCP, single strand conformation polymorphism; SDS, sodium dodecyl sulfate; LDH, lactate dehydrogenase; CHE, cholinesterase; ss, single strand; ds, double strand; EDTA, ethylene diamine tetraacetate.

ターンは変化すると報告されている^{1,6-9)}。今回われわれは、泳動条件の再現性が高いと考えられるファストシステムを用いて、ゲル濃度、バッファの種類 (native, SDS 加)、温度の泳動パターンに及ぼす影響について検討した。

方 法

1. 対 象

われわれが塩基配列を決定して明らかとなった LDH-A, B 遺伝子の変異^{3-5, 10-12)}, butyrylcholinesterase (CHE) 遺伝子の変異¹³⁾のあるエクソン領域を PCR 増幅した DNA を以下の SSCP 分析の対象とした。

2. SSCP 分析

PCR 増幅した DNA とホルムアミド含有溶液 (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol) を等量混合し、80°C で熱変性させ ssDNA とした溶液をファストシステムを用いてポリアクリルアミドゲルを支持体として電気泳動を行った。泳動後、同システムの development unit により銀染色を行い、ssDNA および dsDNA を検出した⁹⁾。なお泳動用ゲルとしては、7.5%, 12.5% homogeneous gel, 8~25% gradient gel を用い、native および SDS 含有の buffer strip で泳動し、ss および double strand (ds) DNA の泳動パターンを比較検討した。この buffer strip は、3% charge-balanced agarose をベースに SDS 含有のもの (以下 SDS と略す) は 0.2 M Tris-tricine buffer, pH 8.1, 0.55% SDS, native は 0.88 M L-alanine, 0.25 M Tris, pH 8.8 の泳動用バッファ溶液を含んでいる。ゲルの種類、濃度による違いをみるために、まず泳動温度は暫定的に 15°C に設定して電気泳動を施行した。ついで、12.5% homogeneous gel についてより詳細に、温度による泳動パターンの違いについて検討すべく、5°C, 10°C, 15°C, 20°C と泳動温度を変化させて SSCP 分析を施行した。

分離された ssDNA を湿潤したゲルから外科用メスで切り出し、再 PCR によって増幅し、得た DNA を直接塩基配列決定した。

結 果

1. 泳動支持体・泳動バッファの違いによる泳動パターンの変化

Fig. 1, Table 1 にゲルの違い、泳動バッファの違いによる泳動パターン、検出効率について示した。8~25% gradient gel は、全体的にバンドがシャープで、

泳動距離が短いにもかかわらず微細な泳動パターンの違いをとらえることができた。また、gradient gel の特徴として、広い範囲を同時に観察することができ、ssDNA だけでなく dsDNA の泳動パターンの変化を 1 枚のゲルで同時に観察できた。しかし一方では、変異による移動度の差は小さく、ヘテロの変異はダブルのバンドから判定できてもホモの変異ではわかりにくい傾向にあった (LDH-B 4, R 173 H; CHE 4, A 539 Y)。

Homogeneous gel では、泳動距離を伸ばしたほうが、異なった移動度はその差を広げ変異を検出しやすくなった。ゲルの濃度は、12.5% のほうが 7.5% よりも、バンドがシャープで、変異の検出、既知の変異との比較検討に有効であった。

変異例ごとに native, SDS のいずれが至適かは異なっており、LDH-A 7 変異 (E 328 U) は native が明らかに有効で、逆に LDH-B 4 (Y 147 U) は SDS, 他の変異についても SDS のほうが劇的な異常パターンが観察された。おおむね、バッファが同じであれば、いずれのゲルを用いても本質的な泳動パターンの形成に類似性を認めた。ただ、分離の善し悪しがゲル濃度に依存していると考えられた。

検出率は、ゲルの種類別では 12.5% homogeneous gel が最も検出率が高く、90% に近かった。また、SDS のほうが native よりも検出率は高かった。一方では、各エクソン別の検出率をみると、泳動する DNA 断片が短いほど検出率がよい傾向があった。たとえば、CHE のエクソン 4 は、いずれのゲルでも、またいずれの泳動条件でも変異が検出された (Table 1)。

2. 温度変化の泳動パターンへの影響

温度変化に伴って native, SDS, いずれのバッファでも泳動パターンが大きく変化した (Fig. 2)。検出効率は、温度により異なっていたが、他に変異・バッファの種類も関連していた。native では 5°C もしくは 10°C で効率がよく、20°C は良好な分離が得られなかった。一方、SDS は 10°C もしくは 15°C が検出効率として高かった (Table 2)。native バッファでの泳動のほうが、検出率に温度の影響が強くみられた。変異の種類からみると、LDH-A 7, E 328 U の変異については SDS バッファではいずれの温度でも検出は困難であった。一方、LDH-B 3, 2 bp の欠落は、native バッファを使用した場合、5°C では検出できるものの SDS に比較して劣っていた。

3. ゲルから切り出した後の ssDNA の塩基配列決定

SSCP 法で異常パターンを示した ssDNA バンド

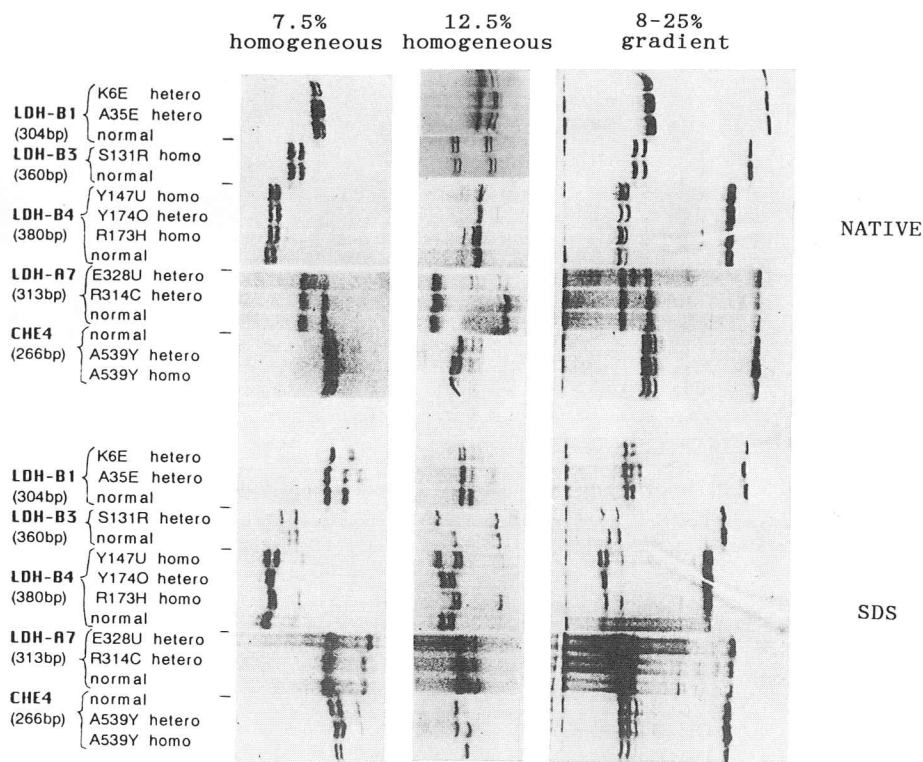


Fig. 1. Effect of different electrophoretic gels and different buffers on SSCP electrophoresis. PCR products containing genetic mutations were subjected to SSCP analysis, using 7.5% or 12.5% homogeneous gel, or 8-25% gradient gel. Buffers used native and SDS. Stained bands show ssDNA on two homogeneous gels. On 8-25% gradient gel, stained bands with slower mobility are ssDNA and those with faster mobility are dsDNA. Anode is to the right.

Table 1. Sensitivities in detecting genetic mutations with different electrophoretic media and with different buffer solutions.

Mutation	Gene, Exon	Native			SDS			No. of cases detected
		7.5	12.5	8-25	7.5	12.5	8-25	
Y147U (TAT→TAG)	LDH-B4 (380 bp)	—	—	—	+	+	+	3
R173H (CGC→CAC)	LDH-B4 (380 bp)	—	+	+	+	+	+	5
Y174O (TAC→TAA)	LDH-B4 (380 bp)	—	+	+	—	+	—	3
S131R (AGT→CGT)	LDH-B3 (360 bp)	—	+	—	+	+	+	4
E328U (GAG→TAG)	LDH-A7 (313 bp)	+	+	+	—	—	—	3
K 6E (AAA→GAA)	LDH-B1 (304 bp)	—	+	+	+	+	+	5
A 35E (GCG→GAG)	LDH-B1 (304 bp)	—	+	—	+	+	+	4
A539Y (GCA→ACA)	CHE 4 (266 bp)	+	+	+	+	+	+	6
No. of cases detected		2	7	6	6	7	7	

+ stands for detectable mutation.

Electrophoretic gels used are 7.5% homogeneous gel, 12.5% homogeneous gel, and 8-25% gradient gel.

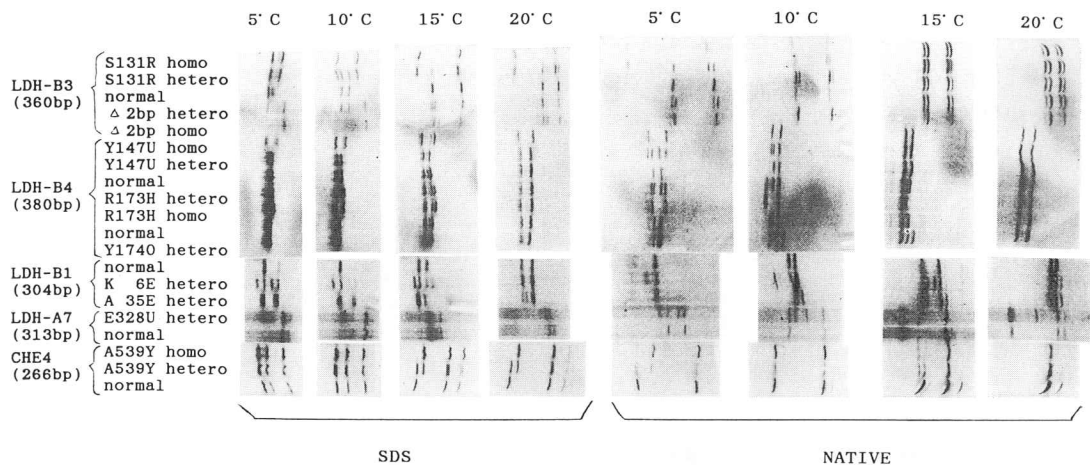


Fig. 2. Effects of different temperatures and different buffers on SSCP electrophoresis. PCR products were subjected to SSCP analysis using 12.5% homogeneous gels, and SDS or native buffer. Electrophoretic temperature was set at 5, 10, 15 or 20°C by Phast System programming. Anode is to the right.

Table 2. Effect of temperature on the sensitivity for detection of genetic mutations.

Mutation	Gene, Exon	Native				SDS				No. of cases detected
		5°C	10°C	15°C	20°C	5°C	10°C	15°C	20°C	
Y 147U (T A T→T A G)	LDH-B 4 (380 bp)	+	+	—	—	+	+	+	+	6
R 173H (C G C→C A C)	LDH-B 4 (380 bp)	+	+	+	—	+	+	+	—	6
Y 174O (T A C→T A A)	LDH-B 4 (380 bp)	+	+	+	—	—	+	+	—	5
S 131R (A G T→C G T)	LDH-B 3 (360 bp)	+	+	+	—	+	+	+	+	7
Δ 2 bp (T T C C→T C)	LDH-B 3 (360 bp)	+	—	—	—	+	+	+	+	5
E 328U (G A G→T A G)	LDH-A 7 (313 bp)	+	+	+	+	—	—	—	—	4
K 6E (A A A→G A A)	LDH-B 1 (304 bp)	+	+	+	+	+	+	+	+	8
A 35E (G C G→G A G)	LDH-B 1 (304 bp)	—	+	+	+	+	+	+	+	7
A 539Y (G C A→A C A)	CHE 4 (266 bp)	+	+	+	+	+	+	+	+	8
No. of cases detected		8	8	7	4	7	8	8	6	

+ stands for detectable mutation.

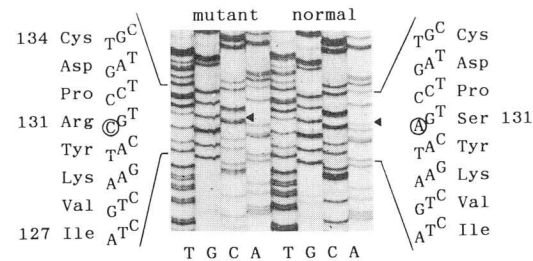


Fig. 3. Direct sequencing of the re-amplified exon 3 of LDH-B gene (a case of LDH-B variant with S 131 R mutation). Abnormal migration bands found by SSCP analysis were cut from the Phast Gel, re-amplified by PCR, and directly sequenced. Circles and triangles show the positions of mutation.

(LDH-B 3, S 131 R) をゲルから切り出し, 再 PCR 後直接塩基配列決定を行った. 切り出したバンドから PCR が成功しさえすれば, 塩基配列決定法がそのまま適用でき, Fig. 3 に示したように A から C への変異が判明した.

考 察

SSCP 原法は, 放射性同位元素でラベルしたサンプル (DNA) を大きなサイズのポリアクリルアミドゲル・プレートを支体として, ファンで冷却し温度コントロールをしながら泳動している. 検出感度, 再現性に影響を与える因子を考慮し各ステップを検討すると, まずサンプル DNA をラベルする段階で, そのラベルの種類により泳動パターンが変化する¹⁴⁾. 次に泳動用のゲルの組

成¹⁾・濃度(高濃度のほうが分離良好¹⁵⁾), 泳動温度^{1,6-9)}などが異なれば泳動パターンは大きく異なる。これら泳動条件を検討する上で, 再現性は非常に大きな問題である。今回用いたファストシステムは既製のゲル・バッファを使用した全自動泳動装置であり, 検討した種々の条件のなかでも, 同じプログラムで同一条件で同一のサンプル(PCR増幅産物)を泳動した場合, ほぼ同じ結果が得られ, 再現性の点できわめて良好であった。このような特徴を有するファストシステムを用いて SSCP 泳動パターンに及ぼす影響を検討した結果, 泳動用ゲルは ssDNA の泳動パターンを評価するには 12.5% homogeneous gel がよいと判明した。既報^{3,16,17)}のように, dsDNA にのみ異常を示したり, dsDNA のほうが異常の検出の容易な変異を対象とする場合, ssDNA, dsDNA を同時に評価できる 8~25%, gradient gel が有利と考えられる。温度およびバッファの種類は変異検出の至適条件に対して相互に関連しており, とくに native では温度による影響を強く受けていた。

SDS は陰イオン性界面活性剤の代表的なもので膜タンパクの可溶化・単離や, タンパクと結合して一定の負の電荷をもたせ, 分子量推定のためのポリアクリルアミドゲル電気泳動に用いられているが, DNA の電気泳動には用いられていない。SSCP 法でしばしば用いられるグリセロールは, その分離能に及ぼす作用は明らかではないが, 弱い変性作用のため折り畳まれた 3 次構造に変化が生じた変異部位が露出しやすくなり移動度に影響しやすくなると考えられている⁹⁾。今回用いた SDS も, 泳動中の ssDNA との相互作用により 3 次構造に影響を与え

ているものと考えられる。そして, LDH-B4 の変異のように泳動パターンが native と比較してバンドが多い例も存在した。これは, SDS が存在しているゆえにランダムコイルになりやすいため, 一つの配列でいくつかの構造をとりやすくなり, 塩基配列の少しの違いがいずれかのバンドの構造に影響を与えるため, 検出効率の上昇につながったと考えられる。しかし SDS の作用も現象論であり, 確かな理由は定かではない。

ファストシステム専用泳動ゲル(Phast Gel)は小さいが, 全体的にバンドが凝縮され細いバンドを形成するため, 微細な違いが判定できた。したがって, 大きなゲルに十分匹敵するものと考えられた。しかし一方では, ファストシステムがなくとも通常のポリアクリルアミド電気泳動装置があれば, 銀染色法で検出することにより手軽に SSCP 分析ができるものと考えられる。試みとして, 第一化学薬品社製の 12.5% homogeneous gel (約 9×9cm) で native, SDS の両条件で低温室で 30mA の定電流で泳動, 同社の銀染色キットを用いて検出したところ, 変異を有する各バンドの同定がほぼ可能であった(Fig. 4)。また, ファストシステムで得られた結果と同様に SDS の泳動条件のほうが異常の検出に優れていると考えられた。

SSCP 法の別の面での応用としてヘテロな異常を容易に解析することができた。すなわち, 異常なバンドを独立して切り出すことができれば, ヘテロな異常でもホモの異常に変換して解析することができる。銀染色で目で見えるそのバンドを切り出すのは, オートラジオグラフィでフィルムとゲルを照らし合わせて行うより明ら

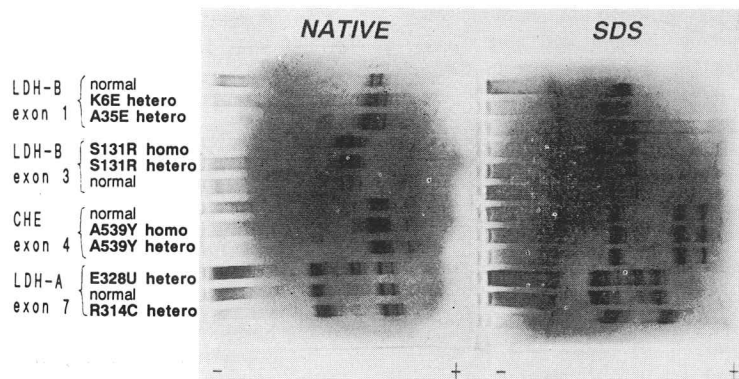


Fig. 4. An example of SSCP patterns on regular polyacrylamide gel electrophoresis.

SSCP electrophoresis was performed under native and SDS buffers, using 12.5% homogeneous gels (9×9 cm, DAIICHI PURE CHEMICALS), at a constant current of 30 mA and at 8°C. After electrophoresis, the gels were stained by the silver staining kit (Silver Stain "DAIICHI").

かに簡単と考えられた。

結論として、SSCP 法で検出しやすいかしくにくいかの予測は現時点ではまだ可能ではない。どの条件で検出しやすいかは対象とする DNA 断片の塩基配列に左右される。したがって、一つの泳動条件のみで変異の有無を判定するのは危険である。サンプルごとに泳動用ゲルの種類 (12.5% homogeneous gel, 8~25% gradient gel), バッファー条件 (native, SDS), 泳動温度によって検出効率が変わるため、至適条件をみいだすことが重要である。われわれは、SDS は 15°C, native は 10°C か 5°C で 12.5% homogeneous gel を用いて検出するのがよく、小さな挿入・欠落の検出には 8~25% gradient gel も有用であると考え、遺伝子変異の検出に適用して複数の遺伝子異常をみいだしつつある。

本研究の一部は第 43 回電気泳動学会春季大会で報告した。本研究の一部は科学研究費 (No. 05671920, No. 05454583) による。

文 献

- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989; 5: 874-9.
- 前川真人. [ワークショップ: PCR とその応用] PCR による LDH サブユニット欠損の解析. *生物物理化学* 1992; 36: 367-71.
- Maekawa M, Sudo K, Li SS-L, Kanno T. Analysis of genetic mutations in human lactate dehydrogenase-A (M) deficiency using DNA conformation polymorphism in combination with polyacrylamide gradient gel and silver staining. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180: 1083-90.
- Maekawa M, Sudo K, Kitajima M, Matsuura Y, Li SS-L, Kanno T. Detection and characterization of new genetic mutations in individuals heterozygous for lactate dehydrogenase-B (H) deficiency using DNA conformation polymorphism analysis and silver staining. *Hum Genet* 1993; 91: 163-8.
- Maekawa M, Sudo K, Kitajima M, Matsuura Y, Li SS-L, Kanno T. Analysis of a genetic mutation in an electrophoretic variant of the human lactate dehydrogenase-B (H) subunit. *Hum Genet* 1993; 91: 423-6.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2766-70.
- Michaud J, Brody LC, Sttel G, Fontaine G, Martin LS, Valle D, Mitchell G. Strand-separating conformational polymorphism analysis: Efficacy of detection of point mutations in the human ornithine δ -aminotransferase gene. *Genomics* 1992; 13: 389-94.
- Kishimoto M, Sakura H, Hayashi K, Akanuma Y, Yazaki Y, Kasuga M, Kadowaki T. Detection of mutations in the human insulin gene by single strand conformation polymorphisms. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 1027-31.
- Hayashi K. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* 1991; 1: 34-8.
- Sudo K, Maekawa M, Ikawa S, Machida K, Kitamura M, Li SS-L. A missense mutation found in human lactate dehydrogenase B(H) variant gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 672-6.
- Sudo K, Maekawa M, Tomonaga A, Tsukada T, Nakayama T, Kitamura M, Li SS-L, Kanno T, Toriumi J. Molecular characterization of genetic mutations in human lactate dehydrogenase (LDH) B(H) variant. *Hum Genet* 1992; 89: 158-62.
- Sudo K, Maekawa M, Shioya M, Ikeda K, Takahashi N, Isogai Y, Li SS-L, Kanno T, Machida K, Toriumi J. Molecular analysis of genetic mutation in electrophoretic variant of human lactate dehydrogenase-A (M) subunit. *Biochem Int* 1992; 27: 1051-7.
- 須藤加代子, 前川真人, 後藤はるみ, 小泉博史, 秋月摂子, 真柄直郎, 菅野剛史. DNA 解析により判明した血清コリンエステラーゼ K-変異の一例. *生物物理化学* (印刷中).
- Lee H-H, Lo W-J, Choo K-B. Mutational analysis by a combined application of the multiple restriction fragment-single strand conformation polymorphism and the direct linear amplification DNA sequencing protocols. *Anal Biochem* 1992; 205: 289-93.
- Savov A, Angelicheva D, Jordanova A, Eigel A, Kalaydjieva L. High percentage acrylamide gels improve resolution in SSCP analysis. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 6741-2.
- Maekawa M, Sudo K, Nagura K, Li SS-L, Kanno T. Population screening of lactate dehydrogenase deficiencies in Fukuoka Prefecture in Japan and molecular characterization of three independent mutations in the lactate dehydrogenase-B(H) gene. *Hum Genet* 1994; 93: 74-6.
- Pieneman WC, Reitsma PH, Briet E. Double strand conformation polymorphism (DSCP) de-

tects two point mutations at codon 280 (AAC →ATC) and at codon 431 (TAC→AAC) of the blood coagulation factor VII gene. *Thromb Haemost* 1993; 69: 473-5.

要 旨

SSCP 分析に影響を与える因子として、泳動支持体、バッファーの種類、泳動温度を選択し、全自動電気泳動装置ファストシステムを用いて、泳動パターンに及ぼす影響を検討した。泳動支持体のなかでは 12.5% homogeneous gel を使用したとき最も遺伝子変異の検出率が

高く、SDS バッファーを用いた泳動条件で native の条件に勝るとも劣らない検出率を得た。ただ、変異の種類によってはいずれかのバッファーに偏って至適条件を示すものも存在した。温度もかなり劇的に泳動パターンに影響を及ぼした。これらの泳動パターンは現時点で予測できないため、一つの泳動条件のみで変異の有無を判定するのは危険である。泳動用支持体の種類 (12.5% homogeneous gel, 8~25% gradient gel), バッファー条件 (native, SDS), 泳動温度によって検出効率が変わるため、該当する変異に至適の条件をみいだすことが重要である。