

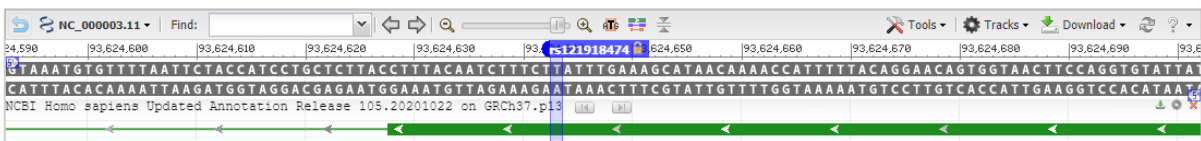
女性アスリート事業 プロテイン S 徳島型バリエーション 解析方法

プロテイン S 徳島型バリエーション概要

SNP (rs121918474)

Nucleotide	Protein
NC_000003.11:g.93624643T>C	
NC_000003.12:g.93905799T>C	
NM_000313.3:c.586A>G	NP_000304.2:p.Lys196Glu
NM_001314077.1:c.682A>G	NP_001301006.1:p.Lys228Glu
NG_009813.1:g.73292A>G	

rs121918474
A/G



NCBI Reference Sequence: NG_009813.1

LOCUS NG_009813 108054 bp DNA linear PRI 10-NOV-2017

DEFINITION Homo sapiens protein S (PROS1), RefSeqGene (LRG_572) on chromosome 3.

ACCESSION NG_009813

VERSION NG_009813.1

青マーカー部分：偽遺伝子 *PROS2P* と異なる塩基

```

72541 cctgctgcgg ggagaagcct ggcagcggga gcaggccccc aagagcacag agacaccggg
72601 gtccggagcc acgacaggaa agctgcagca gcatccgggg agtgtggggc tcctatctgc
72661 tctgtggagt gggaggccct ggcccacatc cccactgcag ctggcgtctt ggcagcggcc
72721 actctacatg ggccactgct gccatctgta gtttatTTTT aaaaataat tataaagatt
72781 tgcctaatag gctcactttt taatttagga aaagtattat ttaaagaag gagttgtgtg
72841 tttttttttc attggttcta ggcttcagga tttttattat agtacacaca attttatttt
72901 tccatgacat gagaataaaa aaataaatag atgtctatct cttcagcca ttccagacca
72961 gtgtagtcct ctgccatgca atgaagatgg atatatgagc tgcaaagatg gaaaagcttc
73021 ttttacttgc acttgtaaac caggttggca aggagaaaag tgtgaatttg gtaagtataa
73081 taaccccgc cccccagctc atcaggattg gtctcctgaa aagttctctg caggttatat
73141 tacttttaaaa ataatttatt tttttcctgt tttagacata aatgaatgca aagatccctc
73201 aaatataaat ggaggttgca gtcaaatttg tgataataca cctggaagtt accactgttc
73261 ctgtaaaaaa ggttttgta tgctttcaa taagaaagat tgtaaaggta agagcaggat
73321 ggtagaatta aaacacattt actatgtgag aataatcca gttagagaaa ttttactagc
73381 aaattttttg aaaaatgata tgtaagtgtc tatactaaca catttttatc gacattgaag
73441 ccttgtgata ctgtggaact gcttttttagc ttttgtttgt ttttgagaga tagggctctca
73501 ctctgtctcc cagactggag tagagtggct ccatcatggc tcaactgtagc cttgacctcc
73561 cgagcttaat tgatcctctg acttcagcct cccaagtagc tgggactaca agtgcattgc
    
```

解析方法

(1) 血液または唾液から DNA を抽出.

QIAamp DNA Mini Kit (Cat. No. 51304) 使用

始める前に、インキュベートを 56 °C にしておく。

Buffer AW1 : エタノール (100%) 25 ml 添加

Buffer AW2 : エタノール (100%) 30 ml 添加

1. 1.5ml マイクロチューブの底に Proteinase K を 20 μ l 入れる。
2. このマイクロチューブにサンプル 200 μ l を添加する。
3. サンプルに 200 μ l の Buffer AL を添加する。ボルテックスによりサンプルを 15 秒間混和する。
4. 56°C で 10 分間インキュベートする。DNA 収量は 56°C、10 分間の溶解後に最高に達するが、インキュベーション時間の延長は、精製される DNA の品質および収量には影響しない。
5. 1.5 ml マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側についた溶液を収集する。
6. サンプルにエタノール (96~100%) 200 μ l を添加し、再び 15 秒間ボルテックスした後、1.5 ml マイクロチューブを数秒間スピンドウンして蓋の内側についた溶液を収集する。
7. QIAamp Mini Spin Column (2 ml チューブ中) に、6. の混合液をカラムの縁をぬらさないように注意して移す。
8. 8000 rpm で 1 分間遠心する。
9. QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml チューブ (付属品) に移す。ろ液が入ったチューブは廃棄する。
10. 500 μ l の Buffer AW1 を 9. の Column に加え、8000 rpm で 1 分間遠心する。
11. QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml チューブ (付属品) に移す。ろ液が入ったチューブは廃棄する。
12. 500 μ l の Buffer AW2 を 11. の Column に加え、13000 rpm で 3 分間遠心する。
13. QIAamp Mini Spin Column を新しい 2 ml チューブ (付属品) に移す。ろ液が入ったチューブは廃棄する。Buffer AW2 が Column に残存するのをさけるため、13000 rpm で 1 分間遠心する。
14. Column を新しい 1.5ml マイクロチューブに移す。200 μ l の Buffer AE を添加し、室温で 5 分間インキュベートした後、8000 rpm で 1 分間遠心する。

(2) DNA の濃度を測定 (Qubit™ dsDNA HS Assay Kit 使用)

1. Working solution を調製する。測定するサンプル数 1 本あたり、Qubit Buffer (大ボトル) 199 μ l と Qubit reagent 1 μ l を 1.6ml チューブに分注する。測定はキットに含まれるスタンダード 2 本とコントロール 1 本および測定するサンプル本数を合わせたものになる。1 サンプル測定の場合、混和減少分を含め 4.5 本分調製となり Qubit Buffer $199 \times 4.5 = 895.5$ μ l Qubit reagent $1 \times 4.5 = 4.5$ μ l となる。
2. Qubit 専用チューブにスタンダード #1, #2 用の Working solution を 190 μ l, コントロールおよびサンプル用に 199 μ l 分注する。
3. 2. のチューブにスタンダード #1, #2 は 10 μ l, コントロールにはスタンダード #2 を 1 μ l, サンプル用には測定する DNA サンプル 1 μ l をそれぞれ分注する。

4. ボルテックスで数秒攪拌した後、遠心して 2 分間インキュベートする。
5. Qubit® 3.0 Fluorometer の画面をタッチして装置を起動させる。
6. 画面左上の家のマークを押し、dsDNA High sensitivity を選択。
7. スタンダードの測定を選択し、サンプルチューブをセットし、スタンダード 1 を測定。続いてスタンダード 2 を測定。
8. サンプル測定を選択し、サンプル量が 1 μ l になっていることを確認して、コントロールを測定する。コントロールの測定値が 9~10 ng/ μ l になっていることを確認する。
9. サンプルをセットし、測定する。

(3) 変異アレル特異的プライマーを用いた PCR

リバープライマー 3'末端にプロテイン S 徳島型バリエーションがくるようにプライマーを設計した。1 箇所の変異のみでは 3'末端の一塩基ミスマッチを検出できないため、2 塩基目もミスマッチとなるように以下のプライマーを設計した。またプライマーには偽遺伝子 *PROS2P* が増幅されないように *PROS2P* と異なる塩基を含むようにした。Forward primer, A-allele primer および Forward primer, G-allele primer のプライマーを用いて塩基 A および G を検出する PCR 増幅を行った。増幅後、(3-A) もしくは (3-B) の方法で解析を行う。

Forward primer : 5' -AGTGTGAATTTGGTACGTATAA-3' PROS1_a-F

Reverse primer

A-allele primer : 5' -GCTCTTACCTTTACAATCTTTC**GT**-3' PROS1_bA-R [FAM]

G-allele primer : 5' -GCTCTTACCTTTACAATCTTTC**GC**-3' PROS1_bG-R [HEX]

TaKaRa Ex Taq (5 units/ μ l)	0.1 μ l
10 \times Ex Taq Buffer	2.5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	2 μ l
DNA Template (約 15ng/10 μ l に調整)	10 μ l
Forward Primer (20 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (20 μ M)	1 μ l
滅菌蒸留水 (up to 25 μ l)	

PCR 条件 (Ex Taq 使用)

①	94°C	5分	} 35 サイクル
②	94°C	30秒	
	55°C	30秒	
	72°C	1分	
③	72°C	5分	

(3-A) ABI PRISM® 310 ジェネティックアナライザによる電気泳動

1. 冷凍保存の Hi-Di Formamide を室温に戻し、GeneScan 500LIZ サイズスタンダードを準備する。
2. 蓋を切って外した ml チューブに 24.5 μ l の Hi-Di Formamide と 0.5 μ l の GeneScan 500LIZ

サイズスタンダードを分注する。増幅した PCR サンプル 1.5 μ l を加え、ピペッティングして攪拌する。

3. 蓋をしてサーマルサイクラーにて 95°C, 3 分間加熱する。
4. 加熱後、素早く氷上に置き、3 分間冷やす。
5. 310 ジェネティックアナライザのオートサンプラーにサンプルをセットして電気泳動を開始する。
6. 変異がないアレルを有している場合 A-allele primer を用いた PCR サンプルに 254bp 付近に青のピークが検出される。G バリエントを有したアレルがある場合 G-allele primer を用いた PCR サンプルに 254bp 付近に緑のピークが検出される。

(3-B) LabChip GX よる電気泳動

1. 増幅した PCR 産物 22 μ l をサンプルプレートに移す。
2. ラボチップマニュアルに従い、電気泳動を開始する。
3. 変異がないアレルを有している場合 A-allele primer を用いた PCR サンプルに 270-280bp 付近にピークが検出される。G バリエントを有したアレルがある場合 G-allele primer を用いた PCR サンプルに 270-280bp 付近にピークが検出される。

(4) シークエンス

(3) の PCR にて G バリエントが検出された場合、以下の方法にてシークエンスを行った。

1. PCR

プロテイン S 徳島型バリエントを含み、偽遺伝子 *PROS2P* が増幅されないように設計された以下のプライマーを用いて PCR 増幅した。

Forward primer : 5' - AGTGTGAATTTGGTACGTATAA - 3' PROS1_a-F

Reverse primer : 5' - ACAGTGAGCCATGATGGAGC - 3' PROS1-R

TaKaRa Ex Taq (5 units/ μ l)	0.1 μ l
10 \times Ex Taq Buffer	2.5 μ l
dNTP Mixture (2.5 mM each)	2 μ l
DNA Template (1ng/ μ l 以下の場合は増やす)	1 μ l
Forward Primer (20 μ M)	1 μ l
Reverse Primer (20 μ M)	1 μ l
滅菌蒸留水 (up to 25 μ l)	

PCR 条件 (Ex Taq 使用)

①	94°C	5 分	} 32 サイクル
②	94°C	30 秒	
	55°C	30 秒	
	72°C	1 分	
③	72°C	5 分	

2. PCR テンプレートの精製 (LaboPass PCR 使用)

- 1) LaboPass PCR をはじめに使用する場合, NW buffer にエタノール 42.5ml を添加しておく.
- 2) PCR 済みのサンプルチューブに PB buffer 125 μ l 分注し, ピペッティングまたはボルテックスでよく混合する.
- 3) この溶液をスピncラムに移し, 13000rpm で1分間遠心する.
- 4) 下のカラムに落ちた溶液をピペットで取り除き廃棄し, NW buffer 750 μ l をスピncラムに分注した後 13000rpm で1分間遠心する.
- 5) 下のカラムに落ちた溶液をピペットで取り除き廃棄し, NW buffer を完全に除去するため, さらに 13000rpm で1分間遠心する.
- 6) カラムを新しい 1.5ml マイクロチューブに移し, 25 μ l の EB buffer を添加する. 1分間インキュベートした後, 13000rpm で1分間遠心する.
- 7) (2) DNA の濃度測定に従い, 精製した PCR テンプレートの DNA 濃度を測定する.

3. DNA シークエンス反応 (BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit 使用)

- 1) 0.2ml マイクロチューブに以下の表の組成で調製する.

BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit

Ready Reaction Premix (-20°C保管)	4 μ l
Big Dye Sequencing Buffer (4°C保管)	2 μ l
プライマー (1 μ M)	3.2 μ l
PCR Template	(※)
滅菌蒸留水	up to 20 μ l

(※) PCR テンプレート濃度および以下の表より決定する.

テンプレート DNA 量

PCR 産物:

100~200bp	1~3 ng
200~500bp	3~10 ng
500~1000bp	5~20 ng
1000~2000bp	10~40 ng
>2000bp	20~50 ng

- 2) サンプルをピペッティングで穏やかに混合させ, 以下の条件でサーマルサイクラーにセットし, PCR 反応を行う.

96°C, 1 min	
↓	
96°C, 10 sec	} 25 cycles
50°C, 5 sec	
60°C, 4 min	
↓	
4°C ∞	

4. スピンカラムを利用した精製 (Centri-Sep™ Spin Columns 使用)

- 1) カラム内へ滅菌水 800 μ l を加える。
- 2) 2時間以上静置し、乾燥したゲルを十分に水和させる。その後、ボルテックスで攪拌する。
- 3) カラムに気泡がないことを確認する。(気泡がある場合は、カラムを軽くたたくことにより除去する)。
- 4) 上のキャップ、下のストッパーの順に外す。(キャップは必ず上から外す。下を先に外してしまうとゲル内に気泡が入ってしまう。)
- 5) ウォッシャーチューブをセットする。
- 6) カラム内の滅菌水をゲル表面まで自然落下させる。
- 7) 捕集した滅菌水を捨てる。
- 8) 再びウォッシャーチューブをセットする。
- 9) 730 x g (2,500 rpm) で、2 分間遠心する。(遠心機にセットする方向はいつも同じにし、325 x g ~ 730 x g で遠心する。2 分間以上遠心しないようにする。また、735 x g 以上で遠心しないようにする。)
- 10) サンプルチューブをセットする。
- 11) 反応液 20 μ l をカラムの中央にアプライする。(チューブの壁などに触れないように注意する。反応液が壁に付いた場合、フリーの蛍光 Terminator が残る原因になる)
- 12) 730 x g (2,500 rpm), 2 分間遠心する。

5. シークエンス

- 1) 0.6ml サンプルチューブの蓋をハサミで切って除去する。Hi-Di Formamide 15 μ l をサンプルチューブに分注し、4.4 で精製した DNA シークエンス反応溶液 15 μ l を加えて、ピペッティングで混合する。
- 2) 95°C で 2 分加熱する。
- 3) 加熱後、すぐにサンプルを氷上に置き急冷する。(室温で 24 時間安定)
- 4) DNA シークエンサー ABI PRISM 310 ジェネティックアナライザオートサンプラーにサンプルをセットする。