

AAV-ITR領域の解読を可能とする高次構造シーケンス解析

アデノ随伴ウイルス (Adeno-associated virus: AAV) は、一本鎖DNAを持つ小型のウイルスで、その両末端にはウイルスの複製や遺伝子挿入に関与する末端逆位反復配列 (inverted terminal repeat: ITR) が存在します。AAVの感染機構を応用して構築されたAAVベクターは、遺伝子治療の分野で非常に有用とされており、その全長の配列解析は重要な課題の一つです。しかし、AAVのITR領域は約140 ntのヘアピン構造を形成するため（図1）、サンガーシーケンス解析では特に配列の読み取りが困難な領域です。本実験では、一般的な難読配列解析技術（ベタイン・DMSO・dGTPの添加）、および弊社独自の高次構造シーケンス解析技術を用いてAAV-ITR領域のシーケンス解析を行い、結果を比較しました。

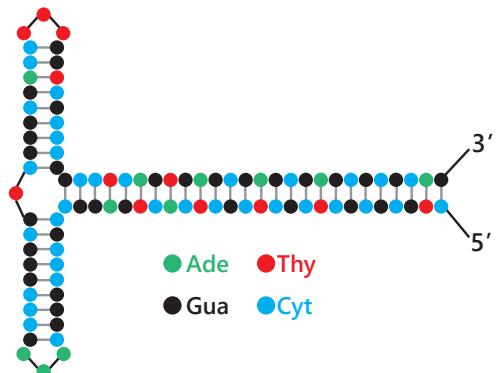


図1 AAV-ITR領域で形成されるヘアピン構造

弊社独自の高次構造シーケンス解析法

高次構造シーケンス解析は通常の解析とは異なり、テンプレートとなるDNAを直接用いてシーケンス反応を行うのではなく、事前に鎖置換活性を持ったPhi29ポリメラーゼと弊社独自組成のdNTPを用いた等温增幅反応を行います。これにより高次構造の形成を阻害したテンプレートDNAを調製し、以降に行うシーケンス反応の効率を飛躍的に高めます。なお、原理上の都合により、テンプレートとなるDNAにつきましてはプラスミドのみの取り扱いとなり、PCR産物には対応しておりません。

解析結果

通常の方法（Big Dyeの利用）やベタイン、DMSOを用いた解析では、ITR領域でピーク強度が著しく低下し、以降の配列を解読できませんでした。dGTPを用いた解析では波形ピークが得られましたが、dGTP試薬添加時特有の波形の重なりが見られ、解読塩基の信頼性が低い箇所が見られました。一方、弊社高次構造シーケンス解析では、良好な波形ピークが得られ、正確な解析結果が得られました（図2）。このように、弊社技術では難読解析領域においても正確な解析結果を得ることができます。AAV-ITR領域など難読配列の解析でお困りの際は弊社高次構造シーケンス解析をご活用ください。

AAV-ITR領域で見られるシーケンス反応阻害

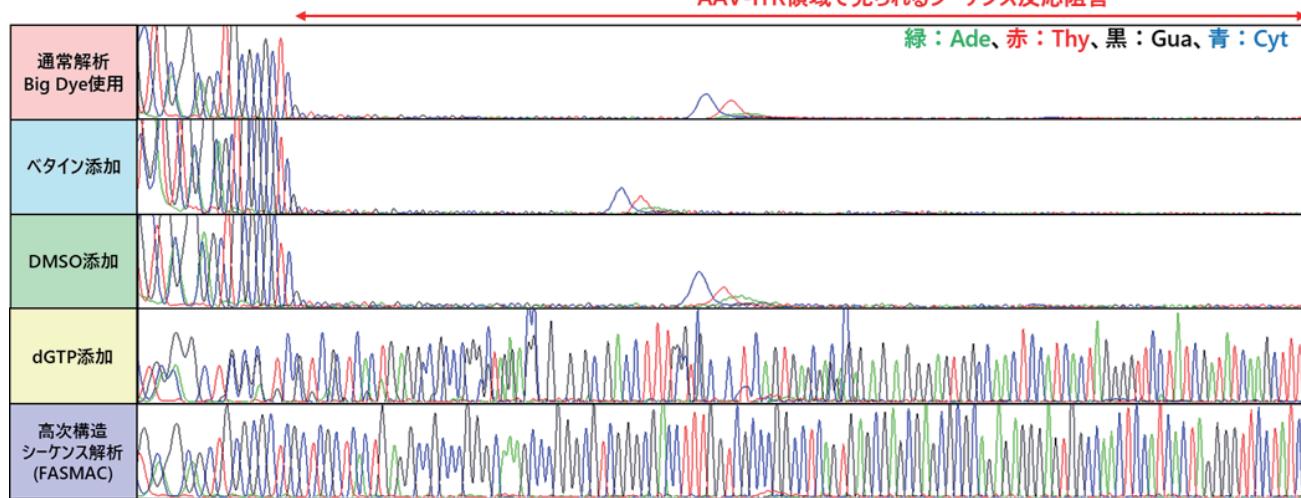


図2 各手法により得られた波形データ