

# PyroMark™ システム

## パイロシーケンス法による遺伝子変異 / DNA メチル化比率の定量解析

PyroMark システムは、定量的な遺伝子解析およびエピジェネティックな DNA メチル化解析で広く使われているパイロシーケンス (Pyrosequencing®) 法によるリアルタイムシーケンス解析システムです。

### PyroMark システムの利点：

- ポリメラーゼによる塩基伸長反応をリアルタイムに検出
- 複数のターゲット領域を確実に定量
- PCR 後 15 分程度の簡単な前処理で測定可能
- ターゲット領域周辺の配列情報を取得可能

### アプリケーション：

- SNP / 遺伝子変異解析 (2 ページ参照)
- DNA メチル化比率の定量解析 (3 ページ参照)
- 微生物同定や薬剤耐性の検出 (4 ページ参照)

## パイロシーケンス法の原理

パイロシーケンス法は、Luciferase の発光反応を利用した合成による配列解読 (sequencing by synthesis) 原理に基づいています。

### ステップ 1

一本鎖 PCR 産物にシーケンシングプライマーをハイブリダイズした後 (図 1)、必要な酵素、基質類を自動分注します\*。

### ステップ 2

dNTP をターゲット配列に対応する順序で 1 種類ずつ添加すると、DNA Polymerase による塩基伸長反応に伴って取り込まれたヌクレオチド量に比例した PPi (ピロリン酸) が遊離します (図 2)。

### ステップ 3

遊離した PPi と反応して Sulfurylase が ATP を産生します。この ATP が Luciferase 発光をカスケードします。光は CCD に検出され、ピーク波形 (パイログラム: Pyrogram) として観察されます。各ピーク (光シグナル) の高さは、取り込まれたヌクレオチド数 (遊離した PPi 量) に比例します (図 2)。

### ステップ 4

dNTP 分解酵素の一つである Apyrase が、反応に寄与しなかった dNTP および ATP を分解します (図 2)。

### ステップ 5

この過程の繰り返しにより相補的な DNA 鎖が形成され、得られるパイログラムの発光ピークから塩基配列が決定できます (図 3)。

\* 自動分注される酵素と基質

酵素: Polymerase, Sulfurylase, Apyrase, Luciferase  
基質: APS (adenosine5' phosphosulfate)、Luciferin

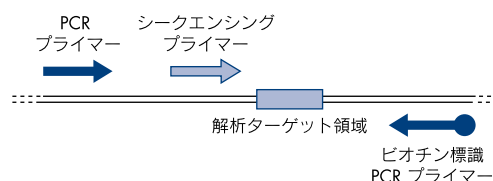


図 1. パイロシーケンス法におけるテンプレートターゲット領域を挟んで片側ビオチン標識した PCR プライマーで増幅した産物をテンプレートとして利用する。

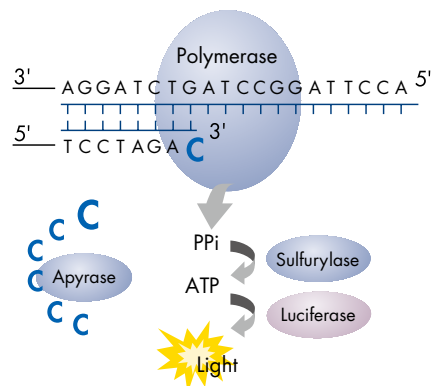


図 2. パイロシーケンス反応の原理\*

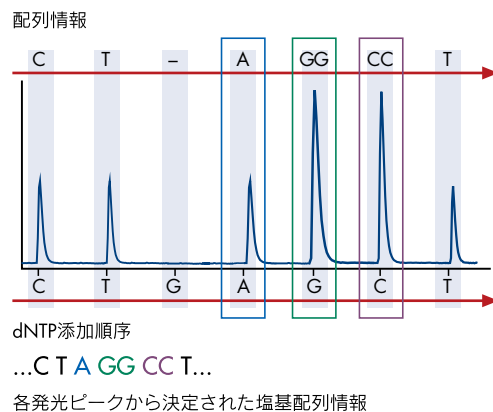


図 3. パイログラム (Pyrogram) の例



# SNP / 遺伝子変異解析

疾病関連遺伝子変異の解析は病原体に感染した組織、腫瘍生検、造血キメラ、ミトコンドリアのヘテロプラスミーなど様々なサンプルにおけるアレル頻度を評価するため、解析には定量的なデータが必要です。パイロシーケンス法は精度の高い定量解析ができるだけでなく配列に基づきデータを取得するので、シーケンス解析が必要とされてきた複雑な変異型をもつターゲット領域にも対応できます。基本的に既知のターゲット配列を想定して、多型情報を含む配列情報を基にソフトウェアが遺伝子型を自動解析します (図 4)。

## パイロシーケンス法による SNP / 遺伝子変異解析の特長：

- 遺伝子型の決定と定量的な頻度解析が可能
- マルチアレルック (tri-tetra allelic) な変異や挿入/欠失にも対応 (図 5、引用文献 1)
- 単一ランで隣接する複数の異なる変異型を同時に測定可能 (図 6)
- ターゲット領域に限定されないフレキシブルなプライマーデザイン
- ターゲット領域周辺の配列情報も取得可能

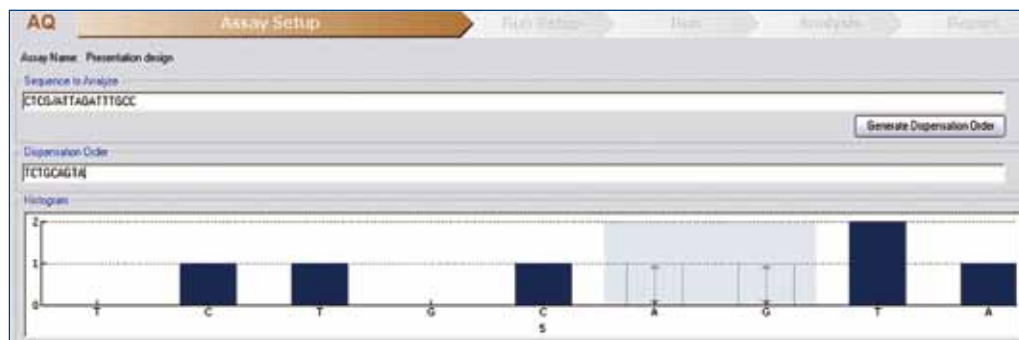


図 4. SNP / 遺伝子変異解析のセットアップ  
シーケンシングプライマー下流のテンプレートの配列と遺伝子多型情報を入力すると (CTCG/ATTAGATTTCGC)、配列に対応する dNTP 添加順序をソフトウェアが自動的に決定、予測されるピークパターンが表示される。グレー部分がターゲット配列 (G/A) であり、A/A ホモの場合は dATP を添加した際に、G/G ホモの場合は dGTP を添加した際に、1 塩基分のピークが検出される。G/A ヘテロの場合は dATP と dGTP を添加した際に、それぞれ 0.5 塩基分のピークが検出される。

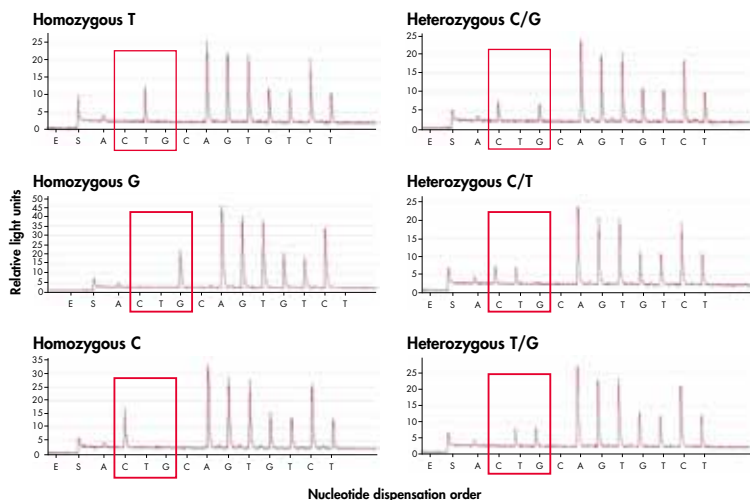


図 5. トリアレルックな解析例  
マルチアレルックな SNP / 遺伝子変異型の解析においてもターゲット配列に対応する dNTP の添加により、ピークのパターンを検出するだけで個別に遺伝子型解析することが可能である。データは C/T/G のトリアレルックなターゲット配列を解析した例であり、左の列はホモ接合体、右の列はヘテロ接合体の結果を示す。

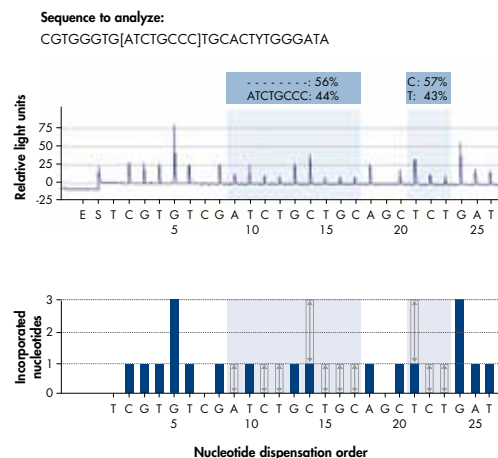


図 6. 隣接する複数の異なる変異型を単一ランで測定可能  
挿入/欠失および一塩基変異という隣接した異なる変異型を単一ランで解析可能。解析データより、シーケンシングプライマー下流で ATCTGCC の配列が挿入 (44%) または欠失 (56%) しており、隣接する一塩基変異は C が 57%、T が 43% ずつ混在している。

# DNA メチル化比率の定量解析

パイロシーケンス法は、単一ランで連続する CpG 部位の DNA メチル化比率を高い再現性で個別に定量解析することができる手法であり(図7)、DNA メチル化比率の定量解析におけるスタンダードとして確立されています(引用文献2、3)。パイロシーケンス法によるメチル化比率の定量解析は、Bisulfite 処理に基づいています。Bisulfite 処理を行なうとメチル化修飾されていない非メチル化シトシンはウラシルへと変化しますが、メチル化シトシンは構造上安定なため変化しません。このように DNA メチル化の差異 (mC/C) を塩基配列の差異 (C/T) に変換して C/T の SNP として定量解析をすることで、DNA メチル化比率を定量的に解析することを可能にします (図8)。

パイロシーケンス法によるメチル化比率解析の特長：

- クローニング不要で高精度な比率解析が可能 (図9)
- 単一ランで複数の CpG 部位を個別に定量解析 (図10)
- ターゲット領域に限定されないプライマーデザインができるため、ほぼ全ての CpG 部位に対応
- Bisulfite 処理の効率確認が可能
- SNP を含むターゲット領域の解析も実現

## 従来のシーケンス法に比べて迅速簡便な結果を実現

従来の Sanger 法で定量的なメチル化解析を行なうには、煩雑で時間のかかる PCR 産物のクローニングが事前に必要です。一方、パイロシーケンス法では PCR 後 15 分程度の簡単な前処理だけで非常に正確なメチル化比率の定量解析を開始できます。

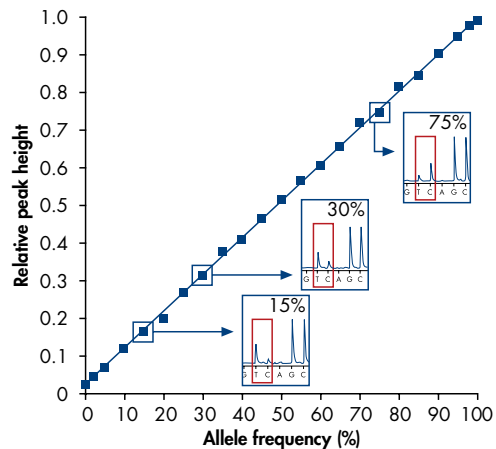


図7. パイロシーケンス法の定量性  
サンプル DNA のアレル頻度にパイログラムのピーク高が比例するため、変異または CpG メチル化部位の塩基におけるピーク高の比を計算することで正確な定量解析を実現。

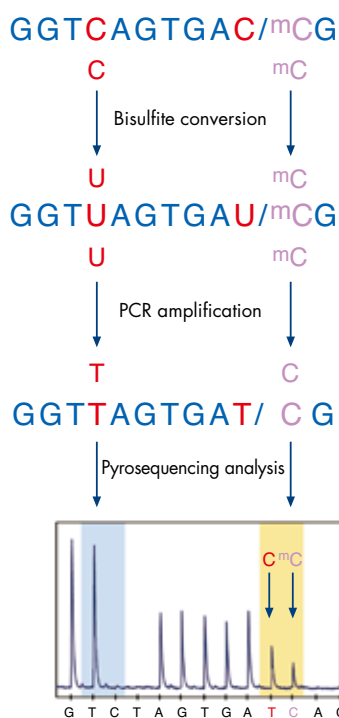


図8. DNA メチル化比率の定量解析ワークフロー

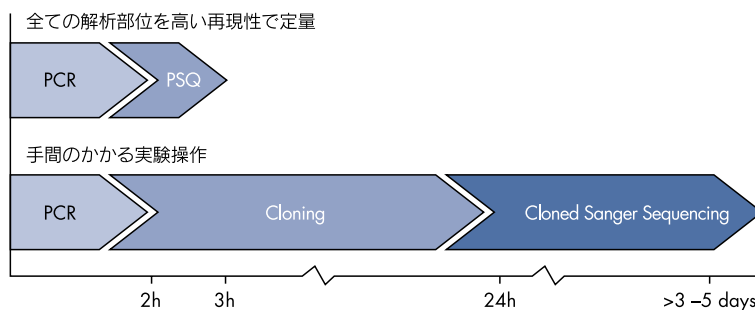


図9. 従来の Cloned Sanger シーケンス法に比べて迅速な解析を実現。PSQ®：パイロシーケンス法

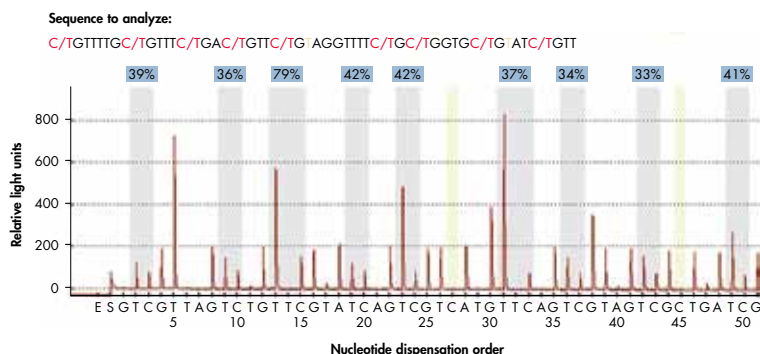


図10. DNA メチル化比率の定量解析データ例

# 微生物同定や薬剤耐性の検出

情報量が多く得られるシーケンス解析は微生物種の同定に最も信頼できる方法ですが、実験工程の煩雑さや測定時間の長さから日常的な解析には適していません。一方、シーケンス情報を含み、かつ高品質で簡便な同定解析ができるパイロシーケンス法は微生物同定の手段として注目を集めています。この手法では、4種類のdNTPを繰り返し添加して得られるピークパターンをソフトウェアでベースコーリングすることにより未知配列を解析します(図11)。例えば16S rRNA遺伝子を用いて生物に共通する保存領域にPCRプライマーを、可変領域の上流にシーケンシングプライマーを設定することにより、単一のプライマーセットで様々な微生物を同定できます(図13、引用文献4)。パイロシーケンス法はSNPや挿入/欠失など様々な変異や多型を定量解析でき、薬剤耐性変異体のタイピングも可能です(図12)。さらに抗生物質耐性遺伝子等のマルチコピー遺伝子の定量にも最適です。



図 11. PyroMark Identifire Software によるシーケンスデータのマッチング解析  
PyroMark Identifire Software を用いることにより、パイロシーケンス解析で取得した配列情報の生データと、カスタムメイドで作成したシーケンスのデータベースとのマッチング解析が可能。

## パイロシーケンス法による微生物解析の特長：

- 迅速かつ正確な微生物の同定を実現
- 1つのシステムで耐性菌の検出と微生物の同定が可能
- 新規の変異にも対応
- 単一ランで複数のアッセイを同時に実現
- 薬剤耐性遺伝子の定量検出が可能

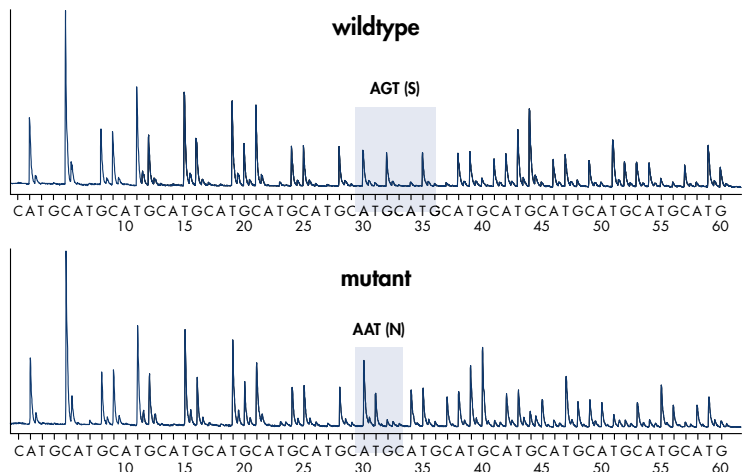


図 12. アダマンタン耐性インフルエンザウイルスの解析例  
CDC (米国疾病対策センター) の Rick A. Bright 氏による、M2 チャンネルプロトコラーであるアダマンタンに対する耐性インフルエンザウイルスを検出した解析例。



図 13. 16S rRNA 遺伝子を用いた微生物の同定解析例  
PCR プライマーを保存領域に設定し、シーケンシングプライマーを可変領域 (青色箇所) 直前の保存領域に設定。




- Staphylococcus aureus*
- Staphylococcus epidermidis*
- Enterococcus faecalis*
- Streptococcus constellatus*
- Paenibacillus* sp.
- Clostridium* sp.
- Pseudomonas stutzeri*
- Acinetobacter* sp.
- Acinetobacter* sp.
- Streptococcus constellatus*
- Shigella boydii*
- Eikenella corrodens*
- Propionibacterium* sp.
- Arcanobacterium* sp.
- Actinomyces odontolyticus*
- etc.



## DNAメチル化解析ワークフロー



## PyroMark システム

	PyroMark Q24 シリーズ		PyroMark Q96 ID システム
	■ PyroMark Q24	■ PyroMark Q24 Advanced	■ PyroMark Q96 ID
			
サンプル処理数	1 ~ 24 サンプル	1 ~ 24 サンプル	1 ~ 96 サンプル
平均リード長 <sup>†</sup>	平均 30 ~ 50 bp	平均 60 ~ 100 bp	平均 30 ~ 50 bp
アプリケーション	CpG (メチル化比率定量解析) SNP (変異解析) AQ (変異の定量解析) SQA (シーケンシング解析)	CpG/CpN (メチル化比率定量解析) SNP (変異解析) AQ (変異の定量解析) SEQ (シーケンス解析)	CpG (メチル化比率定量解析) SNP (変異解析) AQ (変異の定量解析) SQA (シーケンス解析)
ソフトウェア	PyroMark Q24 Analysis Software PyroMark Assay Design Software 2.0 <sup>§</sup>	PyroMark Q24 Advanced Analysis Software PyroMark Assay Design Software 2.0 <sup>§</sup>	PyroMark Q96 ID Software PyroMark Assay Design Software 2.0 <sup>§</sup>
PyroMark 試薬	PyroMark Gold Q24 Reagents	PyroMark Q24 Advanced CpG Reagents <sup>¶</sup> PyroMark Q24 Advanced Reagents**	PyroMark Gold Q96 Reagents
サンプル前処理	PyroMark Q24 Vacuum Workstation	PyroMark Q24 Vacuum Workstation	PyroMark Q96 Vacuum Workstation
電源	100 ~ 240 V AC、47 ~ 63 Hz、 1.1 ~ 0.45 A (アース)	100 ~ 240 V AC、47 ~ 63 Hz、 1.1 ~ 0.45 A (アース)	100 ~ 240 V AC、50 ~ 60 Hz、 1.1 ~ 0.45 A (アース)
サイズ(W x D x H)	39 x 52.5 x 42 cm	39 x 52.5 x 42 cm	52 x 62 x 49 cm
重量	27.5 kg	27.5 kg	52 kg

<sup>†</sup> リード長はアッセイによって異なります。 <sup>§</sup> 別売となります。 <sup>¶</sup> CpG 部位の解析、ロングリード用です。 \*\* SNP/ 変異の解析、ショートリード用です。

### 引用文献

- Ogino S, Kawasaki T, Loda M, Fuchs CS. et al. (2005) Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. J Mol Diagn. **7**, 413.
- Tost J, Dunker J, Gut IG. (2003) Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. Biotechniques. **35**, 152.
- Yamamoto E, Toyota M, Suzuki H, Kondo Y, Shinomura Y. et al. (2008) LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in Helicobacter pylori-related enlarged-fold gastritis. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. **17**, 2555.
- Tuohy MJ, Hall GS, Sholtis M, Procop GW. (2005) Pyrosequencing as a tool for the identification of common isolates of Mycobacterium sp. Diagn Microbiol Infect Dis. **51**, 245.

## PyroMark Assay Design Software

PyroMark Assay Design Software は、パイロシーケンス解析に最適なアッセイデザインをサポートするので、プライマー設計に費やす時間を最小限に抑えることができます。

### PyroMark Assay Design Software の特長：

- 簡単な操作で PCR プライマーとシーケンシングプライマーを一度に設計可能（図 14）
- パイロシーケンス解析に最適なプライマー条件がデフォルトで設定済み
- SNP / 遺伝子変異解析、メチル化比率の定量解析、ショートシーケンス解析のすべてのアプリケーションに対応

Step 1 (目的配列の入力)



Step 2 (ターゲット部位の選択)



Step 3 (プライマーセットの選択)



図 14. アッセイデザインのワークフロー（例；DNA メチル化アッセイ）

目的の配列（Bisulfite 処理前）を入力し、ターゲット部位を選択してスタートボタンをクリックすると最適なプライマーセットのリストが表示される。

## PyroMark CpG Assay および PyroMark Custom Assay

QIAGEN が提供する GeneGlobe ウェブツール ([www.geneglobe.com](http://www.geneglobe.com)) で、様々な遺伝子に対応するデザイン済みの PyroMark CpG Assay が検索可能です。パイロシーケンス解析用にデザインされた DNA メチル化アッセイは、PCR 特異性を高めるために全ヒトゲノムに対してチェック済みです。アッセイの至適化に費やす時間を最小限に抑え、最高の解析成功率を実現します。全てのプライマーは、至適化済みの濃度と品質でお届けします。

GeneGlobe ウェブツールにある PyroMark Custom Assay により、お客様デザインによる様々な DNA 配列に対応するアッセイ用プライマーセットを至適化済みの濃度と品質で入手できます。

# PyroMark Vacuum Workstation

## 迅速かつ簡便なサンプルの前処理

PyroMark Vacuum Workstation は、パイロシーケンス解析に最適なサンプルの迅速かつ簡便な前処理のための専用機器です。この Workstation で PCR 産物の一本鎖化とシーケンシングプライマーのアニーリングの工程を行ないます。

### PyroMark Vacuum Workstation の特長：

- 同時に 24 または 96 サンプルの前処理を 15 分以内で完了 \*
- 最小限のピペッティング回数を実現
- 専用のフィルタープローブを定期交換することで繰り返し使用可能

### サンプル前処理のワークフロー（図15）

1. ビオチン標識した PCR 産物をストレプトアビジン・コーティングした Sepharose ビーズに固定
2. アルカリ性の Denaturation Solution で PCR 産物を一本鎖化
3. Wash Buffer でサンプルを洗浄
4. シーケンシングプライマーをアニーリング

PyroMark Vacuum Workstation は、フィルタープローブを装着した PyroMark Vacuum Prep Tool（図 16）と PyroMark Vacuum Worktable（図 17）および吸引ポンプ、廃液ボトルで構成されています。サンプルの前処理はフィルタープローブ表面に Sepharose ビーズを吸着した状態で行ないます。

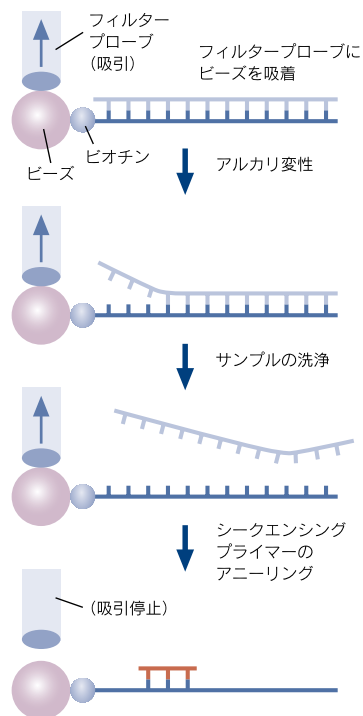


図 15. サンプル前処理のワークフロー

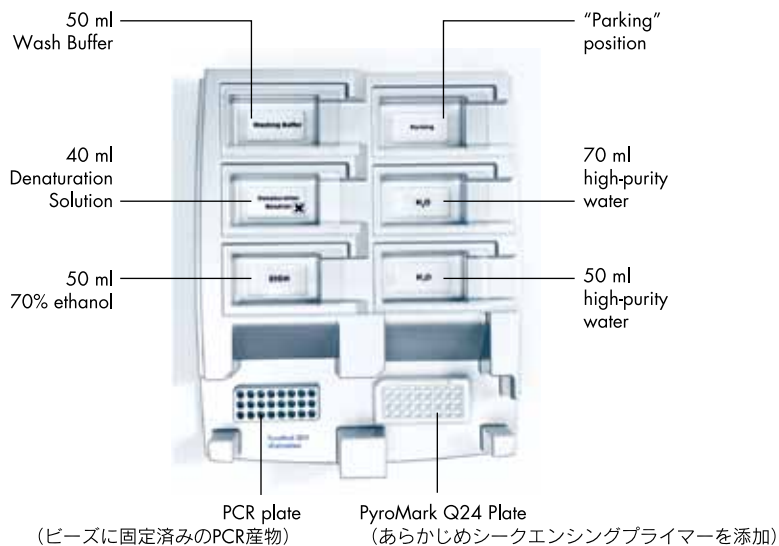


図 17. PyroMark Vacuum Worktable



図 16. PyroMark Vacuum Prep Tool

\* PyroMark システムに合わせて PyroMark Q24 Vacuum Workstation と PyroMark Q96 Vacuum Workstation があります。

## オーダーインフォメーション

製品名	内容	Cat. no.
<b>PyroMark Q24 シリーズ</b>		
PyroMark Q24	PyroMark Q24 本体、PyroMark Q24 Analysis Software*、ユーザーマニュアル、設置・基本取扱説明、1年間保証 <sup>†</sup>	9001514
PyroMark Q24 PrioPLUS	PyroMark Q24 本体、PyroMark Q24 Analysis Software*、ユーザーマニュアル、設置・基本取扱説明、3年間保証 <sup>‡</sup>	9001914
PyroMark Q24 Advanced	PyroMark Q24 本体、PyroMark Q24 Advanced Analysis Software*、ユーザーマニュアル、設置・基本取扱説明、1年保証 <sup>†</sup>	9002270
PyroMark Q24 Advanced PrioPLUS	PyroMark Q24 Advanced 本体、PyroMark Q24 Advanced Analysis Software*、ユーザーマニュアル、設置・基本取扱説明、3年間保証 <sup>‡</sup>	9002273
PyroMark Q24 Vacuum Workstation	PyroMark Q24 Vacuum Workstation 一式 (1年間保証) 24 サンプルから同時に一本鎖 DNA を調製するワークステーション	9001519
Notebook, small Instrument	ノート型コンピューター	9020962
<b>PyroMark Q96 ID システム</b>		
PyroMark Q96 ID	PyroMark Q96 ID 本体、PyroMark Q96 ID Software*、ユーザーマニュアル、ノート型コンピューター、設置・基本取扱説明、1年間保証 <sup>†</sup>	9001525
PyroMark Q96 ID PrioPLUS	PyroMark Q96 ID 本体、PyroMark Q96 ID Software*、ユーザーマニュアル、ノート型コンピューター、設置・基本取扱説明、3年間保証 <sup>‡</sup>	9001916
PyroMark Q96 Vacuum Workstation (110 V)	PyroMark Q96 Vacuum Workstation 一式、1年間保証 96 サンプルから同時に一本鎖 DNA を調製するワークステーション	9001528
<b>関連製品</b>		
PyroMark Assay Design Software 2.0 <sup>§</sup>	PyroMark Assay Design Software 2.0 (1ライセンス) 最適な PCR およびシーケンシングプライマーを設計するソフトウェア	9019077
PyroMark CpG Assay (200)	PCR and sequencing primers for Pyrosequencing analysis of gene-specific CpG methylation after DNA bisulfite conversion (200 reactions; tube format)	978746
PyroMark Custom Assay (200)	User-designed PCR and sequencing primers for Pyrosequencing analysis (200 reactions; tube format)	978776

\* ソフトウェアは 1 ライセンスです。 † 購入時には保守契約もご検討ください。 ‡ 2 年間保証のオプションもございます。お問い合わせください。  
§ 追加ライセンス (5 ライセンス) もございます。お問い合わせください。

記載の製品は研究用です。疾病の診断、治療または予防の目的には使用することはできません。最新のライセンス情報および製品ごとの否認声明に関しては [www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp) の "Trademarks and Disclaimers" をご覧ください。QIAGEN キットの Handbook および User Manual は [www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp) から入手可能です。

**PyroMark システムに関する詳細は [www.qiagen.com/goto/Pyrosequencing](http://www.qiagen.com/goto/Pyrosequencing) をご覧ください。**

Trademarks: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube™, QIASymphony™, DNeasy®, EpiTect®, GeneGlobe®, PyroMark™, Pyrosequencing®, PSG® (QIAGEN Group).  
本文に記載の会社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。2302057 06/2013 © 2013 QIAGEN, all rights reserved.

[www.qiagen.co.jp](http://www.qiagen.co.jp)

株式会社 キアゲン ■ 〒104-0054 ■ 東京都中央区勝どき 3-13-1 ■ Forefront Tower II  
Tel:03-6890-7300 ■ Fax:03-5547-0818 ■ E-mail:techservice-jp@qiagen.com

