

myTags®DNAプローブを用いた蛍光in situハイブリダイゼーションによる染色体同定

色が染色体の同定をもたらす

特定の染色体を同定するために顕微鏡を使用することは、細胞遺伝学的ツールが存在しない生物を扱う場合や、たとえある生物を扱う場合でも困難な場合があります。標的的特異的なDNA蛍光in situハイブリダイゼーション (DNA FISH) は特定の染色体遺伝子座を検出するための強力な手法です。Arbor Biosciences社のmyTags®製品は、合成FISHプローブの設計と製造のためのサービスを提供し、標的配列に固有のコンピューター設計されたカスタムプローブセットを提供します。これらの技術では、各染色体上に1つ以上の遺伝子座を標的とする非常に特異的なプローブのコレクションを生成することができます。染色体ごとに検出する遺伝子座の数を慎重に選択し、各腕の位置を特定し、1つ以上の標識する色を使用することにより、特定の種のすべての染色体を固有にコード化することができます。これは、「chromosome indexing」として知られている技術で、中期スプレッド (metaphase spread)上の凝縮された各染色体は色付きのスポットの固有のパターンによって明確に識別できます。

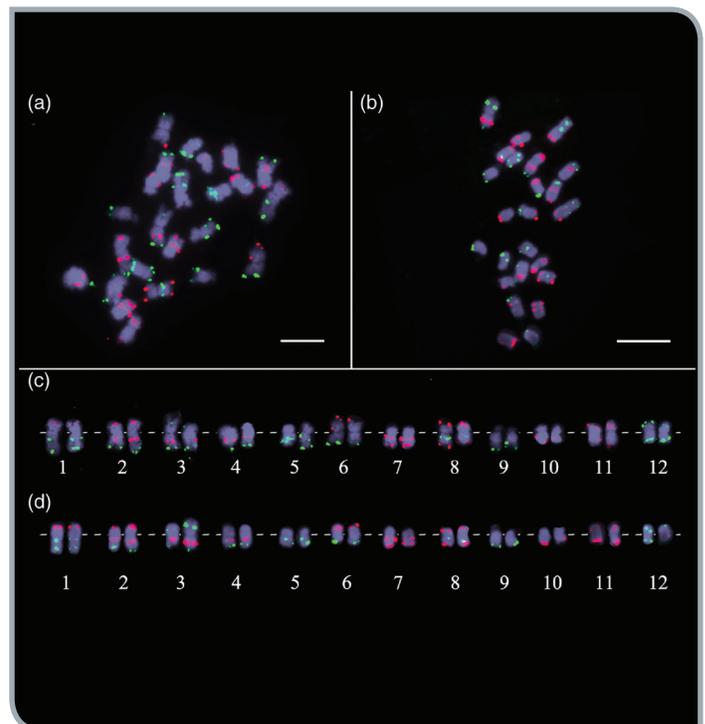
ここでは、植物におけるchromosome indexingのいくつかの公開されたアプリケーションを提示し、異なる種の新しい染色体インデクシングプロジェクトを実施する際に考慮すべき主要なポイントを概説します。この使いやすい手法は、植物、動物、昆虫、またはその他の種における多くの重要なゲノム研究の質問に取り組むために利用できます。

Chromosome indexing蛍光in situ hybridizationのアプリケーション

染色体の同定

図1 (Liu et al.、2019) は、染色体を完全に分類するための2つの固有のプローブセットの使用を示しています。1つ目のプローブセットは緑色の蛍光タグで標識され、2つ目のプローブセットは赤色の蛍光タグで標識されました。特徴的な赤と緑のパターンによって、イネの異なる2種 (Zhongxian 3037とNipponbare) の12組の染色体を簡単に分類することができました。

図1. 有糸分裂中期の体細胞染色体にFAM (緑) およびジゴキシゲニン (赤) プローブを使用した、有糸分裂中期染色体上の (a) Zhongxian 3037および (b) NipponbareイネのFISH解析。 (a) および (b) のサブパネルからの (c) Zhongxian 3037および (d) Nipponbareの体細胞における12組の染色体の染色体再構成。スケールバー = 5µm。



Indexed Chromosomesによる倍数性の決定

DNA FISHによるIndexing chromosomesは倍数性レベルへの洞察を提供します。各染色体のコピー数は、図2 (Meng et al., 2019) に示すように、中期スプレッド (metaphase spread) から簡単にカウントできます。この例は倍数性サトウキビ *S. spontaneum* です。図の上部は完全な中期細胞のすべての染色体を示し、下部はDNA FISHの緑と赤のシグナルのパターンに基づいてソートおよびインデックス付けされた染色体を示しています。その結果、8つの相同染色体が8グループあることがわかりました。

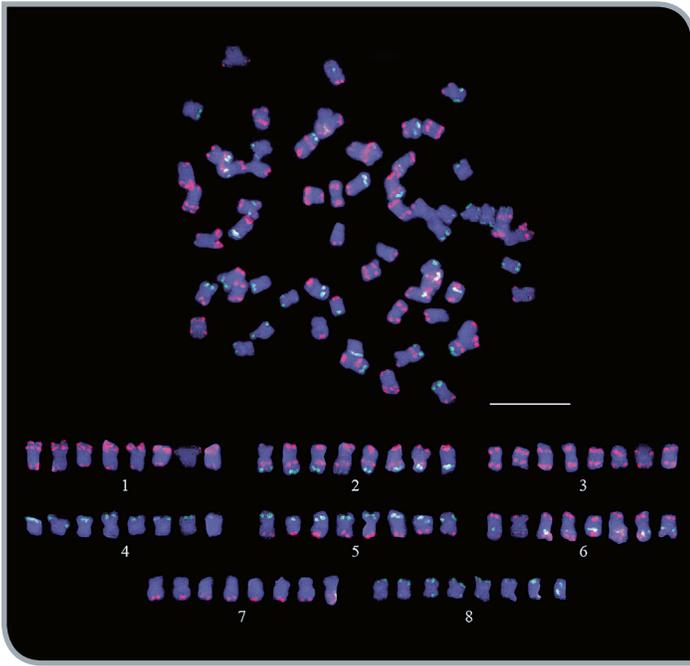


図2. 倍数性サトウキビ *S. spontaneum* の相同染色体グループ。スケールバー = 10 μ m

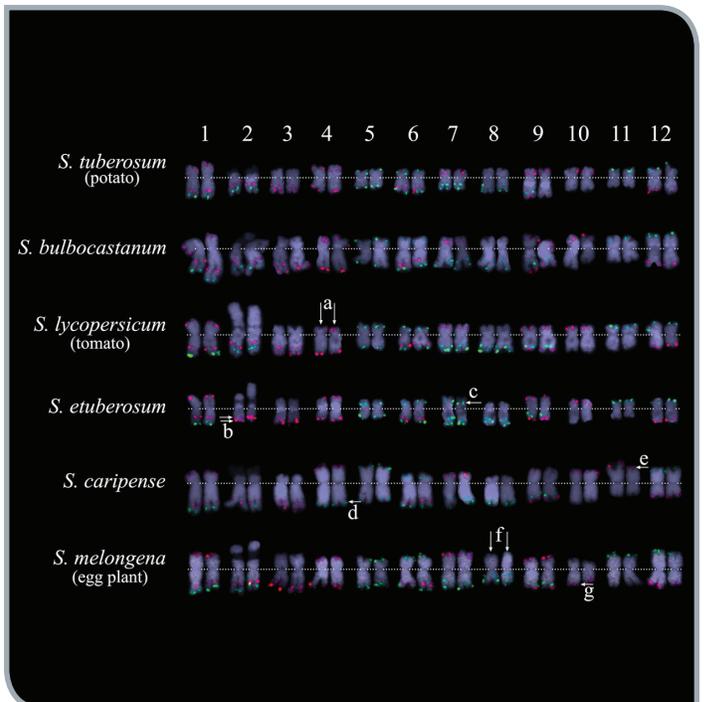
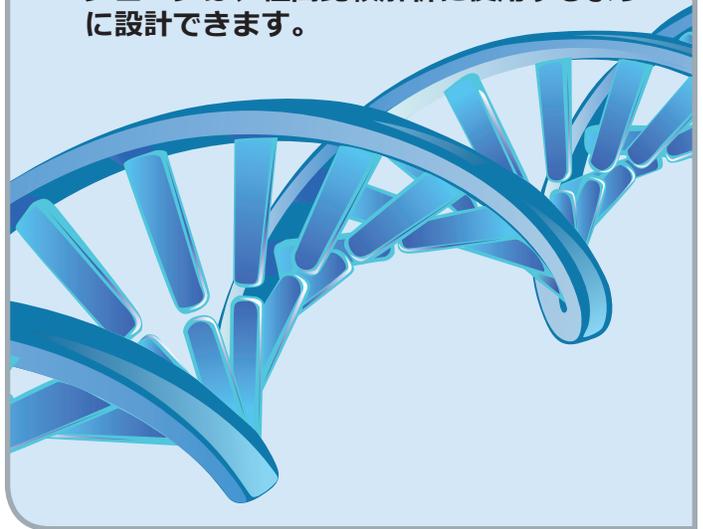
進化を介した染色体の追跡

Chromosome indexingは、関連種間の染色体関係を特定するための強力なツールであることが証明されています。Solanum属で証明されているように、シーケンスされたゲノムを持つ1つ以上の種に由来するプローブセットを適用して、シーケンスされていない関連種の染色体を特定できます。図3は、インデックス作成戦略により、特定の種における染色体再編成のレベルが同定されました。このタイプの再配置は、農学上重要な植物の栽培品種にも見られます。

図3. ジャガイモのゲノムに由来しトマトのゲノムに対して交差選択された2つのプローブセットを使用して、*Solanum*属の6つのメンバーの染色体にインデックスを付けました。矢印は、ジャガイモと比較して染色体の再構成を指します。詳細については、Braz et al 2018を参照してください。

myTAGS® INDEXING DNA FISHの利点

- DNA FISHによるChromosome indexingにより、核型の明確な生成が可能になります。
- コンピューター支援設計により、BAC由来のプローブと比較して標的特異性の高いプローブが生成されます。
- 完全にカスタム化された合成オリゴヌクレオチドプローブは、任意の色素で標識できます。
- プローブは、種間比較解析に使用するよう設計できます。



CHROMOSOME INDEXING プロジェクトを成功させるための設計戦略

Chromosome indexing 実験を設計する際に利用すべき重要な原則がいくつかあります。染色体に組み込まれている配列化された参照ゲノムへのアクセスが必要です。これは、蛍光プローブが局在する染色体上の特定の遺伝子座を指定するために使用されます。これらの特定の蛍光「スポット」は、各染色体に固有のパターンを生成します。各スポットは、明確で均一な明るい蛍光シグナルとして簡単に分離する必要があります。信号の明るさは、スポットごとの標識プローブの数によって制御されます。各染色体アーム上のスポットの間隔は、それらを別々の蛍光シグナルとして分離する能力を決定します。Arbor Biosciences社の専門チームはCHROMOSOME INDEXINGプロジェクトのこれらの重要な設計原則の実装を支援します。

1. 色の数

典型的な設計では、各染色体に十分なインデックス付きシグナルパターンを持たせるために2色を使用します。しかし染色体の数が非常に少ない生物には、単一の色を使用することが可能です。染色体の数が多き種では、3番目の色を使用すると効果的です。

2. スポットあたりのプローブの数

Arbor Biosciences社では一般に、蛍光スポットあたり最小1,800のプローブを推奨します。プローブ数が大きいほど、明るい信号が得られます。標準の27,000プローブライブラリは、1つの色で最大15のスポットを提供できます。通常1,800プローブは数百キロベースの領域をカバーします。各スポットのターゲットサイズを一定にするのではなく、各スポット内でプローブ数を一定に保つことによって、均一なシグナルを維持することがより重要です。

3. スポットの数

スポットあたりのプローブの数を最大するにはスポットの数を最小に使用することをお勧めします。アクロセントリック染色体、サイズが大きく異なる染色体、またはセントロメアの位置が染色された中期染色体で容易に認識できる種の場合は、腕の長さを識別するためのもう一つの指標として使用できます。例えば、短腕に緑色の斑点がある染色体は長腕に緑色の斑点がある染色体とは異なります。

4. 染色体腕のスポットの位置

均一なハイブリダイゼーションパラメーターと最適な設計のために、スポットはセントロメアから可能な限り離れている必要があります。このため、非常に短い染色体の腕は、スポットの位置を特定するのに適したターゲットではない可能性があります。

5. 隣接するスポット間の距離

腕ごとに複数のスポットを簡単に分離するには、少なくとも5~15 Mbでそれらを離すことが理想的です。これは一般的なガイドラインであり、すべての生物に当てはまるとは限りません。Arbor Biosciences社チームは、設計のこの部分を改善するための支援ができます。

6. 複数種でのハイブリダイゼーション

プローブを複数の種にハイブリダイズするように最適化できます。関心のある他の種の配列決定されたゲノムへのアクセスが有効です。種間の配列相同性が低下すると、ハイブリダイゼーションシグナルの明るさが低下することがあります。

7. 特殊なケース：既知の転座のために設計する

Chromosome indexingは、主要な転座イベント（染色体の端から別の染色体への転座のような）または種や栽培品種全体の染色体シンテニーを追跡するために使用できます。インデックス作成戦略は、転座によって作成された新しいパターンが固有であり、他の染色体パターンと一致しないように、すべてのサンプルで予想されるパターンを中心に設計できます。

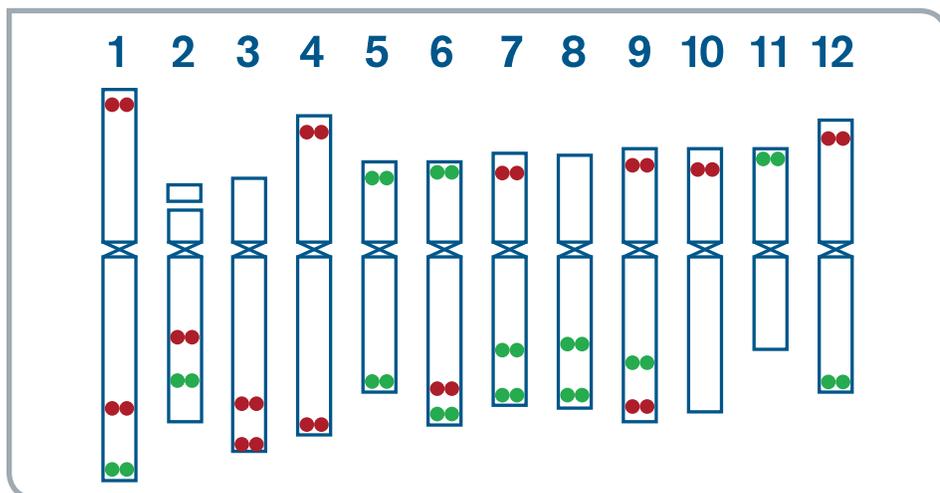


図4 各染色体を確実に特定するための2色 chromosome indexing戦略。スポットは、同時に標識される2つの染色体に対応するペアとして、および個別のスポットとして表示されます。
(Braz et al., 2018)。

デザインに必要とされるものは何ですか？

- 実験する種（1つ以上）のアセンブルされたゲノム配列
- 図4のような図の形式でのIndexing戦略
- 各スポットがターゲットとする領域のおおよその座標
- オプションでArbor Biosciences社が製造するための設計をご自身で実行することも可能です。

Arbor Biosciences社より何が提供されますか？

- 無料のプローブ設計サービス（オプション）
- カスタム設計された合成インデックスプローブのセット
- オプションのラベリングサービス
- 研究発表に必要な詳細なプローブ設計コンテンツ

結論

Chromosome indexingは、標的特異的DNA蛍光In Situ ハイブリダイゼーション（FISH）を使用して染色体を迅速に識別および追跡するための強力で使いやすい手法です。この強力なツールを使用して、主要な染色体構造の変化を識別し、それらをサンプル間ですばやく比較できます。Arbor Biosciencesの無料のプローブ設計サービスとカスタマイズされたmyTags®FISHプローブの手頃な価格の製造により、お客様の次の染色体インデックスプロジェクトの成功をお手伝いします。ご興味がありましたら、弊社までお問い合わせください。

問い合わせ先：

プライムテック株式会社
ライフサイエンス事業部
バイオ試薬ソリューション部
reagents@primetech.co.jp

REFERENCES

- Liu *et al.* (2019) **Dual-color Oligo-FISH Can Reveal Chromosomal Variations and Evolution in Oryza Species.** *The Plant Journal.*
- Meng* *et al.* (2019) **Characterization of a Saccharum spontaneum with a Basic Chromosome Number of $x = 10$ Provides New Insights on Genome Evolution in Genus Saccharum.** *Theoretical and Applied Genetics.*
- Braz *et al.* (2018) **Comparative Oligo-FISH Mapping: An Efficient and Powerful Methodology to Reveal Karyotypic and Chromosomal Evolution.** *Genetics.*

* Contact author is kwang@fafu.edu.cn



web www.arborbiosci.com
email info@arborbiosci.com
phone 1-734-998-0751
twitter @ArborBio

Chromosome Identification
[arborbiosci.com/genomics/
cytogenomics](http://arborbiosci.com/genomics/cytogenomics)



お問合せ：
プライムテック株式会社
www.primetech.co.jp

ライフサイエンス事業部 バイオ試薬ソリューション部
東京都文京区小石川1-3-25 小石川大国ビル2F
Phone : 03-3816-0851 (代表) Fax : 03-3814-5080
E-mail : reagents@primetech.co.jp