

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

迅速・簡便・超高感度な新規SNPs検出法による
薬剤応答性遺伝子診断システムの開発
に関する研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 藤原 一彦

平成18（2006）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
迅速・簡便・超高感度な新規SNPs検出法による 薬剤応答性遺伝子診断システムの開発に関する研究 -----	1
藤原 一彦	
II. 分担研究報告	
1. MP E X法の実用化への基礎検討に関する研究 -----	1 3
木下 健司	
横山 兼久	
藤本 健太郎	
2. MP E X法による薬物応答性遺伝子の 多型判定法の開発に関する研究 -----	4 5
猪子 英俊	
森川 實	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	6 7
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	6 9
(投稿中論文)	

総括研究報告書

迅速・簡便・超高感度な新規SNPs検出法による
薬剤応答性遺伝子診断システムの開発に関する研究

主任研究者 藤原 一彦 住友ベークライト株式会社

バイオ製品開発プロジェクトチーム リーダー

研究要旨

本年度は、住友ベークライトのホスホリルコリンを有する基板上で実現したプライマー伸長法であるMP EX法の実用化に向けて、基礎検討を実施した。MP EX法での迅速化、簡便化の検討、MP EX反応に最適な諸条件の検討を行い、一定温度でのプライマー伸長反応、可視化検出法を確立し、検出精度の向上、遺伝子の検出に要する時間の短縮のための諸条件を明らかにすることが出来た。さらにMP EX法での実際の遺伝子検出実験を細菌および実際のヒト血液試料を用いたHLAハプロタイプの判定を検討した。MP EX法を用いて菌の同定が可能であることを確認し、ヒトSNPsについても検出が可能であることを確認できた。

(分担研究者)

猪子英俊	東海大学 大学院医学研究科 委員長
	同 医学部基礎医学系 学系長
森川實	ジェノダイブファーマ株式会社 代表取締役社長
木下健司	住友ベークライト株式会社
	バイオ製品開発プロジェクトチーム 技師長
横山兼久	住友ベークライト株式会社
	バイオ製品開発プロジェクトチーム 部長研究員
藤本健太郎	住友ベークライト株式会社
	バイオ製品開発プロジェクトチーム 研究員

A. 研究目的

近年、医薬品副作用の低減という観点から、薬物応答性、QOL向上を目的とした自己免疫、生活習慣病、癌など疾患共通または特有な遺伝子要因の解明並びに疾患感受性遺伝子の階層化などの研究が進み、更には、これらを的確に遺伝子診断できる遺伝子多型マーカー（SNPs、マイクロテライト）の迅速な探索方法とこれらを利用した遺伝子診断評価方法のニーズが急速に高まっており、このSNPsを含む遺伝子多型解析は、「テーラーメイド医療」確立のための、一つの根幹を成すものである。

現状、SNPs解析の一手段であるDNAチップは特異性・選択性が低く、低感度で再現性が低いことが指摘されており、臨床・検査用としてはまだ見通しが立っていないのが実状である。一方、網羅的遺伝子情報が取得可能な時代が到来し、その個人遺伝子情報を如何にして守るかと言う課題も大きな問題となりつつある。このような状況から、遺伝子解析の加速化・簡便化には日本独自に設計・開発されたDNAチップシステムを安価・大量に供給されることが、羨望されてい

る。

我々は、住友ベークライトの基板技術を応用し、医療機関や患者の要請や各症状に合わせた、わが国の標準となる遺伝子診断システムの開発を目的とする。

我々は、基板上にDNAプライマーを固定化し、検体側のDNA或いはRNAを鋳型として、ポリメラーゼによりDNA鎖を伸長させることにより検体中の遺伝子を検出する方法（以下、MP EX法と記載します。）を、住友ベークライトのプラスチック製基板を用いて実現した。このMP EX法による遺伝子検出は、原理的に、従来のDNAマイクロアレイに比較し、遺伝子検出特異性が高く、特にSNPsの検出に適する。

現状、本MP EX法は、実現が出来た段階であり、臨床・検査用の用途への展開を図るためには、遺伝子検出特異性の高さ、操作の簡便性、高い感度、短時間での検出できることが必要条件となる。我々の最終的な目標は、研究課題である、迅速・簡便・超高感度な新規SNPs検出法による薬剤応答性遺伝子診断システムの開発にある。本年度は、迅速化、簡便化、高感度化を図るために、本MP E

X法について、基本的な要素条件を抽出し、MP E X法の完成度を高めることを第一課題とした。続いて、迅速化、簡便化を図るため、MP E X反応時間の短縮化検討、および簡便化検討の1つとして可視化による検出検討を行った。

また、MP E X法による実際の生体サンプルによる検出性について検証するため、菌類を題材としてリボゾームDNA 遺伝子による菌の同定実験を行った。さらにSNP sの検出性について、ヒトのSNP sを題材にして検証実験を行い、MP E X法によるSNP s検出改良のための、基礎的な知見データの収集を行った。

B. 研究方法

MP E X法に関する基礎的な部分の検討研究は、住友ベークライトが実施し、ヒトのSNP sの検出実験については、東海大学・ジェノダイブファーマにおいて実施を行った。

以下、各実施機関において実施した研究概要を記載する。詳細の研究方法については、各分担研究報告を参照いただきたい。

まず、MP E X法による遺伝子検出条件

の基礎検討を実施した。

- ・定温でのMP E X反応の検討
当初MP E X法開発時のヒートサイクルを加える方法に代え、一定温度でMP E X反応（基板上のプライマー伸長反応）が行えるか検討を行った。

- ・シグナルのばらつき改善
MP E X反応溶液処方検討、MP E X反応時に使用するハイブリ用カバー材質の検討を実施

- ・MP E X反応溶液中の試薬量の最適化
dNTP、PCR Buffer、Ex Taq 等について、添加量を検討し、最適化を行った

- ・MP E X法反応温度条件検討
定温でのMP E X反応において、当初の37℃以外で条件を検討、シグナルへの影響等について検討を行った。

- ・MP E X法に使用するDNA伸長酵素量の検討
酵素量を増やすことにより、シグナル量および反応速度への影響をみた。

- ・MP E X反応溶液中の基質濃度の検討
MP E X反応液中の基質（Cy3-dUTP、

dATP、dCTP、dGTP) の増加によりシグナルの向上が図れるか、検討を行った。

・MPEX法における反応温度と遺伝子検出特異性の検討
プライマーのT_m値と反応温度による、遺伝子検出特異性について検討を行った。

・可視化検討

将来のベッドサイドでの遺伝子診断のための検討として、可視化による検出方法の検討をおこなった。

MPEX法での検出方法において、アルカリフォスファターゼ、BCIP/NBT系での発色検出法を、住友ベークライト製MPEX用基板を用いて検討を行った。

・生体サンプルによる遺伝子検出

生体サンプルによるMPEX法での遺伝子検出検討を行った。

生体サンプルとして菌を選択し、23SリボゾームDNAを用い、MPEX法により菌の同定が可能か検証実験を行った。PCRにより、23SリボゾームDNAの特定部位を切り出し、MPEX法により菌の同定を行った。大腸菌、サル

モネラ菌、黄色ブドウ球菌、緑膿菌の同定性を検証した。

さらに、MPEX法によるSNPs検出条件の検討を行った。ヒト血液試料を用いて、HLAハプロタイプ判定のための検討を行った。タイピング法の検討に用いた血液試料よりDNAの抽出・精製SNP解析を行った。PCRにより遺伝子の切り出し及び増幅を行った後、MPEX法を行う、2段階法によるSNPsの判定の可能性を検討した。

C. 研究結果

住友ベークライトのグループならびに東海大学・ジェノダイブファーマの各グループでの研究結果について、概要を記す。詳細については、各々の分担研究報告を参照して頂きたい。

住友ベークライトのグループは、MPEX法の実用化の検討を行い、MPEX法における、プライマー伸長反応について、従来のような、ヒートサイクルを行うことなく、一定温度で、シグナルの検出が可能であることを見出した。以後、一定温度でのMPEX法について検討を行っていった。

また、シグナルの検出について、アルカリフォスファターゼBCIP/NBTの系を用いることにより、可視化にてシグナル検出が出来ることを見出し、MP EX法による可視化検出法を確立した。また、MP EX法に関する諸条件の検討により、ポリメラーゼ添加量、プライマー設計におけるT_m値の設定条件が、MP EX法での遺伝子検出における、シグナル強度（感度）および、検出特異性向上において、重要であることを確認した。

また、実際の生体サンプルを用いた遺伝子検出検討として、細菌の同定実験を行い、上記MP EX法諸条件の検討結果を基に、酵素量等検出条件を設定し、23SリボゾームDNAの遺伝子配列により、菌の同定が可能であることを確認した。さらに、菌の同定において、MP EX反応に要する時間短縮化検討を行い、従来のMP EX法に要する時間に比較し約半分の1.5時間に短縮することが出来た。

東海大学、ジェノダイブファーマのグループは、住友ベークライトのグループによって確立した一定温度でのMP EX

法による可視化での遺伝子検出法を用いて、HLAのハプロタイプの判定を行った。血液試料から抽出精製したDNA試料を用いて、PCRによりSNPsの存在部位の切り出しおよび増幅を行った後、MP EX法を行うことにより、HLAのハプロタイプの判定が出来ることを確認した。

D. 考察

我々は、新しい遺伝子検出法として、図. 1に示すMP EX法を開発した。住友ベークライトの基板を用いることで、基板にプライマーDNAを固定化し、検体中のDNA鎖又はRNA鎖を鋳型とし、DNAポリメラーゼやDNAトランスフェラーゼ、ヌクレオチドモノマーの存在下、PCRと同様なヒートサイクルを加えることにより、固定化したプライマーDNA鎖が伸長する。ヌクレオチドモノマーの1つに蛍光色素等の標識を行うことにより、DNAプライマーの伸長反応の際、標識が導入されることにより、シグナルとして蛍光等により検出が可能となる。本法方法は、住友ベークライトの、表面にホスホリルコリン基を導入した基板において可能であることを確認し実現

した、遺伝子検出法である。

基板表面に、プライマーを固定化し、検体中のDNA鎖等を鋳型にして、伸長反応を起こし、遺伝子を検出する方法は、過去に提唱はされているが、実現までに至っていないのが実状であった。その理由は、十分にシグナルが得られないことにある。

我々は、本方法の開発にあたり、従来のガラス製のDNAチップ用基板や住友ベークライトのプラスチック製アルデヒド導入基板等との比較を行っている。住友ベークライトの表面にホスホリルコリン基を有する基板は、ハイブリ効率が高くまた、基板上に固定化されているが、水の中でハイブリをしているような挙動を示す。またヒートサイクル後の、プライマーDNAの保持も良好であり、固相化したプライマーの伸長に適用できる可能性を見出し、検証実験の結果本法の実現に至った。住友ベークライトの表面にホスホリルコリン基を有する基板は、基板へのDNAの非特異的な吸着を抑えバックグラウンドを抑制する目的で、当初は開発されたものであるが、ホスホリルコリン基を有することから、生

体の膜表面に近い環境を提供していると考えられる。このことが、ハイブリを促進しかつ、DNAポリメラーゼの酵素反応を促進し、従来のDNAチップ用基板では、成し得なかった、基板上に固定化されたDNA鎖の伸長反応を可能にしたと考えられる。

本方法は、原理的にSNP sの検出に有力な手段となり得る。本方法を用いて、SNP sの遺伝子検出法を開発し、臨床検査用途への展開を目指して、薬剤応答性遺伝子の検出システムを構築することを課題としている。臨床検査用途への展開を図るには、迅速化、簡便化、高感度化、高精度化が必要である。現状、本MPEX法は、住友ベークライトのホスホリルコリン基を有する基板により、実現は出来たが、臨床検査用途へ向けて、技術確立が急務である。

簡便化、迅速化という課題からみると、当初のPCRに準じたヒートサイクルによるプライマーの伸長反応は、大きな妨げとなると考えられる。そこで、我々はまず、ヒートサイクルを必要としない、一定温度でのDNA鎖伸長を試みた。検

討の結果、37℃等一定温度の反応で、シグナルが検出され、ヒートサイクルをせずとも、遺伝子検出ができることを確認した。ホスホリルコリンを表面に有することが、ヒートサイクルを不要にした可能性が高い。ヒートサイクルの不要化により、本MPEX法遺伝子診断システムに組み込むにおいて、簡便化において、大きな意味をもつ。なぜならば、PCRに準じたヒートサイクルが必要となると、基板専用のサーマルサイクラーが必要となり、そのサーマルサイクラーもやや大掛かりなものとなり、ベッドサイドやポイント・オブ・ケアのための、システムからはほど遠いものとなる。一定温での反応は、小さなインキュベータがあれば、MPEX反応を行えることであり、特別な反応装置を必要としないため、システムの導入においても低コスト化を図ることが出来る。

さらに、我々はシグナルの検出において、簡便化、迅速化が図れないかについて検討を行った。

従来、DNAチップにおいては、蛍光標識を行い、専用のマイクロアレイスキャナーにより、スポットシグナルの検出

が行われている。蛍光試薬は、非常に高価なものであり、また、蛍光スキャナーも非常に高価なものであり、ベッドサイドでの診断には向かない。測定に高価な装置を必要としていては、本方法をベッドサイドでの遺伝子診断に用いることができない。そこで、我々は、検出において高価な蛍光スキャナーが不要な可視化による、スポット検出の方法を検討した。

その結果、従来ウェスタンブロット法などで用いられている、アルカリフォスファターゼ、BICP/NBTを用いた方法で、可視化でスポットの検出を可能にすることができた。本可視化法は、例えばOAスキャナーやデジカメにより取り込んだ画像から、スポットの濃さを数値化することも可能である。可視化が出来たことによって、将来の遺伝子診断システムの構築において、検出機器の簡素化とコスト削減が図れるものと確信する。上記のような可視化は、ウェスタンブロットのようなメンブレンを用いなければ、スポットの検出は不可能であったが、住友ベークライトの基板で可能となったのも、基板表面環境が、生体の膜表面に類似していることにより、酵素反応が起こ

りやすいことが、可視化を可能にしたと考える。この、酵素反応の優位性を利用し、シグナルの増幅を手段を加え、検出感度のいっそうの向上が図れることを示唆している。

また、本MPEX法の信頼性の向上を図るため、上記一定温による反応法ならびに可視化法について、諸条件について検討を行い、シグナルの向上およびプライマー伸長反応時間の短縮、遺伝子検出特異性向上を図るための条件を見出すことが出来た。各々の検討項目についての考察は、分担研究報告において記載されているので割愛させていただく。本研究課題において、「迅速」、「簡便」、「超高感度」を挙げているが、その前提は、正確に遺伝子の検出が出来ることであり、遺伝子検出時の特異性の向上は、重要な課題である。当初のMPEX法は、ヒートサイクルにより、プライマーDNAの伸長を行うものであったが、上記のような検討結果を踏まえ、一定温度でのプライマー伸長反応についての検討を行っている。本研究の結果として、一定温度でのプライマー伸長反応で、遺伝子特異性に影響する要因、シグナル強度に影響する

要因、反応速度に影響する要因について明らかにすることが出来た。このことは、実際の生体サンプルでの遺伝子検出へと検討を進める上で、重要な知見となった。

生体サンプルでの遺伝子検出検証実験では、23SリボゾームDNAを用い、PCRにより一部の配列部分を切り出し、MPEX法により菌の同定が出来ることを確認した。今まで、モデル化した系でMPEX法の検討を行ってきたが、実際の生体サンプルで検出できることを確認できたことになる。菌を用いた実験は、生体サンプルを用いたモデル実験として実施が容易であり、今後、MPEX反応の改良研究を進める上で、有用な手段となると思われる。

東海大学・ジェノダイブファーマのグループでSNPs検出の検討を行った結果、ヒトSNPsの検出も可能であった。本検討においても、SNPsの存在する領域について、PCRにより切り出しを行い、MPEX法により遺伝子の検出を行っている。より迅速化および簡便化を図るためには、PCRによる切り出しを行わず、ゲノムから遺伝子検出が行えることが理想である。しかしながらゲノム

から直接MPEX法行った場合、切り出したDNA鎖に比較し、ゲノムDNAはMPEX法の最初のステップであるハイブリが起こりにくく、検出スピードが落ちる可能性が高く、ある程度の断片化は必要である可能性が高い。

超音波処理等で断片化するだけでいいのか、PCRによるある特定部位の切り出しおよび増幅が必要なのか、見極めることが、今後の進め方を決める上で重要であると考えられる。早い時期に、PCR等による切り出しの必要性について、早い時期に検証を行いたい。

PCRによる切り出しが必要であれば、PCRの簡便化および迅速化を図るためには、マイクロフルイディクス（微細流路中）でPCRを行う方法ことも検討していきたい。マイクロ流路による反応は、反応時間も短くかつサンプル量も微量で済むことから、ベッドサイド診断を実現するには優位である。PCRによる切り出し部分とMPEX反応部分を1枚の微細流路基板上で行えるようにすることも今後の展開上考えていく必要があると考える。

さらに、SNPs検出精度を上げるた

めの検討を進めていく必要がある。

本MPEX法では、プライマーDNA鎖伸長反応の有無により、検出目的となる遺伝子に有無を検出するものであり、プライマーにおけるSNPsの位置をどこにすべきか、その他ポリメラーゼとしての酵素の選択等、1塩基の違いを正確に検出するための検討を行う必要がある。

次年度は、より迅速・簡便化を図り、SNPsの精度を上げ、薬剤応答性に関連するSNPsの検証データの蓄積を行い、実際の薬剤応答遺伝子の検出システム構築へと進める予定である。

E. 結論

MPEX法の実用化への基礎検討を行った結果、一定温度でのMPEX法の技術確立、MPEX法での可視化検出技術の確立、高感度化のためのMPEX反応条件の確立を行うことが出来、MPEX法について、臨床・検査用途への展開において必要な条件となる、迅速化、簡便化、検出時間の短縮化を図るための基礎技術の確立が出来た。さらに、菌由来の生体サンプルでの遺伝子検出検証研究により、生体サンプルにおいても検証が可能なこ

とが確認できた。さらに、ヒト由来のSNPs検出検討において、SNPs検出が出来ることが確認できた。次の段階としての、実際のヒト検体から薬剤応答性に関するSNPsの検出検討に移るための、基礎的な検討研究を終了した。

次年度は、SNPsについて検出精度および検出感度を上げるための検討および、実際の薬物応答に関連するSNPsを抽出し、各々のSNPs検出における検証実験を行い、データの蓄積を行う。薬剤応答性遺伝子診断システム構築のための、基礎を構築する。

F. 健康危険情報

特に記載すべき内容なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(投稿中)

K.Kinoshita, K.Fujimoto, T.Yakabe, S.Saito,
Y.Hamaguchi, T.Kikuchi, S.Murata,
D.Masuda, W.Takada, S.Funaoka, S.Arai,
H.Nakanishi, K.Yokoyama, K.Fujiwara,
K.Matsubara

Multiple primer extension by DNA
polymerase on a plastic device with a

biocompatible polymer

Nucleic Acid Research

2. 学会発表

・安齋洋次郎、猪谷真由、谷本美由紀、
加藤文男、藤本健太郎、木下健司

「マイクロアレイを用いた迅速な特定
微生物試験法の確立」

日本薬学会第126回年会

2006年3月28日～30日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1-1. 特許出願

(本年度出願分)

特願 2005-144108

「遺伝子の検出方法」

特願 2005-184136

「DNA鎖伸長方法、DNA鎖増
幅方法およびDNA鎖伸長用
マイクロアレイ」

特願 2005-263988

「DNA鎖増幅方法」

特願 2006-43350

「遺伝子の検出方法及び遺伝子検
出担体」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

意匠等の出願および登録なし

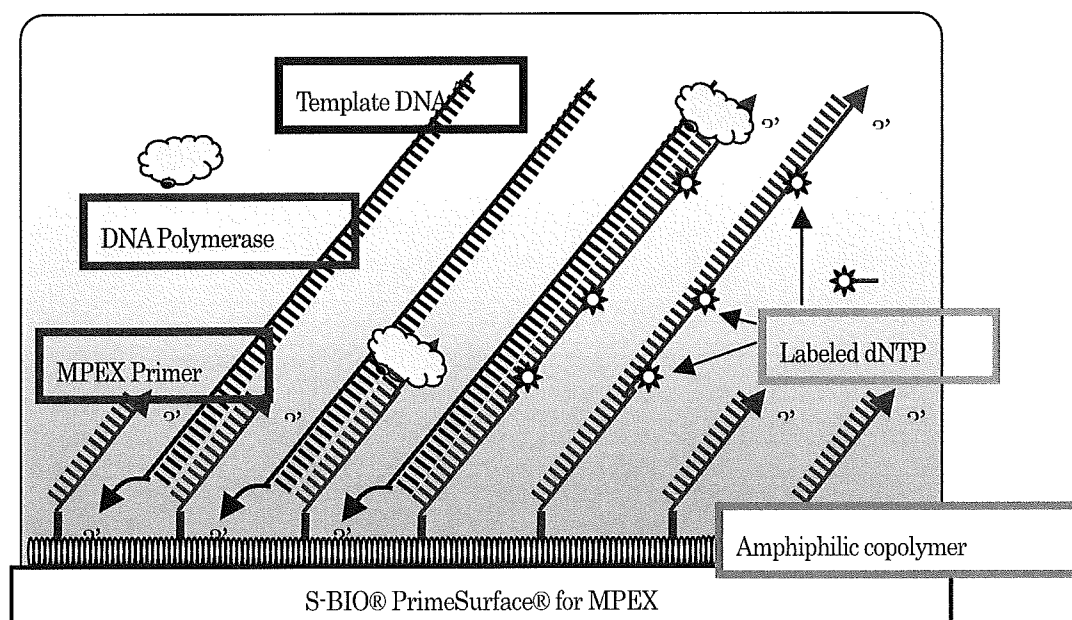


図. 1 MPEX法原理

分担研究報告書

MPEX 法の実用化への基礎検討に関する研究

分担研究者

木下 健司	住友ベークライト株式会社 バイオ製品開発プロジェクトチーム 技師長
横山 兼久	住友ベークライト株式会社 バイオ製品開発プロジェクトチーム 部長研究員
藤本 健太郎	住友ベークライト株式会社 バイオ製品開発プロジェクトチーム 研究員

研究要旨

住友ベークライトの表面にフォスフォルルコリンを有するプラスチック基板により、MPEX (Multiple Primer Extension) 法を実現した。

本MPEX法は、基板上に固定化したプライマーDNAを検体中のDNA鎖又はRNA鎖を鋳型として伸長させ、このプライマーの伸長をシグナルとして、遺伝子の検出を行うものである。本MPEX法は、DNAチップに比較し、迅速、簡便、高感度化が臨める方法であり、本方法を用いたSNPsの検出法の確立を研究課題として目指している。本年度、分担研究として、MPEX法の実用化のための基礎研究をおこなった。本研究により、1) 一定温によるプライマー伸長法の確立、2) 可視化によるスポット検出法の確立、3) MPEX法の諸条件の検討による最適条件の設定、4) 生体サンプルとして菌を用いた遺伝子検出検証ならび検出に要する時間の短縮を図ることができ、MPEX法の実用化のための基礎技術を確立することが出来た。本研究の成果を基に、本MPEX法によるSNPsの検出のための基礎検討、さらにはヒト検体でのSNPsの検出実験へと、研究を進める基板技術の構築が出来た。

A. 研究目的

住友ベークライトは表面にフォスホリルコリン基を有する高分子を表面に有するプラスチック製DNAチップ用基板を開発した。このDNAチップ用基板はDNAの固定化効率が高い、ハイブリ効率が低い、バックグラウンドが低い等の、一般的なDNAチップ用基板として有用な特長を有する。それに加え、固定化した後のDNAの安定性が高いこと、基板上での酵素の働きに適した環境を有することを見出した。

一方、従来から基板上に、プライマーとしてオリゴDNAを固定化し、検体に含まれる遺伝子を鋳型として、固定化されたプライマーDNAを伸長させ遺伝子を検出する方法が提唱されていた。この方法は、プライマー伸長法と称され、SNPs検出に有効な手段とされているが、プライマーを効率良く伸長させることができないこと、伸長後のオリゴDNAが不安定ではずれしまい、伸長したオリゴDNAが保持できない等の理由から、このプライマー伸長法は実現に至っていなかった。

我々は、住友ベークライトの上記基板

が、プライマー伸長法に適するであろうという予測のもと、本基板を用いて、プライマー伸長法を試みた結果、従来のDNAチップ用基板では実現出来なかった本方法を、この基板上で行えることを見出した。このプライマー伸長法に対し、MP E X(Multiple Primer Extension)法と命名した。このMP E X法は、遺伝子検出において従来のDNAチップ法に比較し、PCRが不要に出来る、反応時間が短い、基板上での増幅が出来高感度が狙える、1塩基の配列の違いを精度高く検出できることが示唆された。これらの特長は、従来のDNAチップに比較して、臨床・検査への適用に最適である。また本基板は、プラスチック製であり、ガラス製のチップのような破損の恐れがなく、感染の恐れを低減できることから好適である。

MP E X法をまず、実用レベルまでもっていくための検討が必要であり、基礎検討として、MP E X法を行う上での諸条件についての検討を行った。

まず、簡便化のための、定温でのMP E X反応について検討を行った、従来のプライマー伸長法は、プライマーの伸長お

よび増幅には、PCR法に準じたヒートサイクルを加えることが必要であるが、定温化により、サーマルサイクラーのような機器が不要となり、簡便な装置でシステムが構築できる可能性を見出すことが出来る。またさらに、遺伝子検出における特異性、感度の向上、反応時間の短縮化のため、プライマー伸長時の酵素量、温度等の情報の蓄積を行った。さらに、簡便化検討の一環として、従来のDNAチップにおける蛍光色素を用いた方法ではなく、可視化による検出方法を検討した。可視化のメリットは、高価な蛍光色素と高価な蛍光スキャナーを不要とし、遺伝子診断におけるコストの削減およびベッドサイドでの診断を可能に出来ることにある。上記、基礎的な検討を行った後、応用編として、実際の生体サンプルでの遺伝子検出が可能か検証実験および生体サンプルを用いる上での条件設定のための検討を行うこととし、生体サンプルとして、比較的扱いが容易な、細菌を生体サンプルの題材とし、菌の同定および、実際の生体サンプル使用における、検出時間の短縮化検討を行った。

以上の研究により、本研究の課題とな

っているSNPsの検出検討実施のための基盤作りを行うことを、本年度の本分担研究の目的とした。

B. 研究方法

1. MPEX法における諸条件の検討

プライマーDNA、ターゲットDNAともに合成オリゴDNAを用いてMPEX反応の基礎条件検討を行った。

MPEX法行うまでの準備に関する基本的な操作は、以下に記す通りである。

(オリゴDNA塩基配列)

オリゴDNA塩基配列は表1に記載のものを選択し使用した。

(基板上へのプライマー固定化)

プライマーは、最終濃度が $10\mu\text{M}$ となるように、 $2\times$ スポッティング液(住友ベークライト製)と滅菌水を用いて調整した。住友ベークライト製MPEX用基板表面に、上記調整したプライマー溶液をピンスポッター(ピン径： $100\mu\text{m}$)を使用して45スポット点着させた。その後、基板をオープンに入れ、 80°C で1時間加熱させ、プライマーを基板表面に固定化させた。この操作により、基

板表面の活性エステル基とプライマー5'末端のアミノ基が結合する。

(ブロッキング)

基板上未反応の活性エステル基を不活化するために、ブロッキング液(住友ベークライト製)を用いた。プライマー固定化済み基板をブロッキング液に5分間室温で浸漬させた後、沸騰水中に2分間浸漬、その後室温の水中に2分間浸漬急冷させることによりブロッキング操作を行った。沸騰水中に浸漬、急冷させることにより、プライマー鎖を確実にほぐし、プライマー伸長反応における、プライマーとターゲットのハイブリ効率を高めることができる。その後、エアブローにより、基板に付着している水分を完全に除去した。

以下、検討内容について記載する。

1-1. 定温によるMPEX反応

MPEX反応の簡便化を図るため、MPEX反応における、ヒートサイクルの必要性について検討した。

MPEX反応時の条件を、ヒートサイクルありとなしで比較を行った。

・サーモサイクルありの場合

(95℃・1分→37℃・3分)×15
サイクル

昇温、降温時間などを含めると、反応時間は90分間

・サーモサイクルなしの場合は、37℃一定温度で90分間で行なった。

上記の条件における、シグナル強度の比較をおこなった。

1-2. MPEX法における可視化検出法検討

当初、蛍光(Cy3)を用いてMPEX反応の基礎検討を行ってきたが、より簡便な方法で検出するために、可視化による検出方法の検討を行なった。

(検出方法)

ウエスタンブロッティング法等メンブレン上の検出に用いられている可視化法を参考にMPEX法での可視化検討を行った。具体的には、MPEX伸長反応時に、Cy3-dUTPの代わりにビオチン標識dUTPを取り込ませ、アルカリホスファターゼ標識ストレプトアビジンでアルカリホスファターゼ標識し、最後にBCIP/NBTで着色沈着させることにより可視化検出した。

(ヌクレオチドモノマー濃度)

Cy 3と比べてビオチンは立体障害が小さいため、プライマー伸長時に容易に取り込まれると考えられるため、表2のとおりにdNTP濃度は蛍光検出の場合と比べて1/10以上低い濃度に設定した。

(伸長反応条件)

MPEX伸長反応の条件は、蛍光検出の場合と同様、37°C一定で150分間とした。

(ビオチンアビジン反応)

1/100濃度のストレプトアビジンアルカリホスファターゼを37°Cで30分間反応させた。表3に処方を示す。

(発色反応)

BCIP/NBT溶液中に基板を浸漬させ、37°Cで30分間反応させ、可視化検出した。

(発色度合いの数値化)

可視化完了した基板は、OAスキャナーで画像を取り込み、さらに画像処理ソフト「誰でもDNAアレイ解析ソフト」で発色の度合いを数値化した。

1-3. シグナルのバラツキの解消検討

本MPEX法は、PCRとは異なり基板上での反応のためPCRと同条件では

再現性の高いデータが出なかった。その原因は、基板上に反応溶液が拡散しないことと考えられた。この問題を解決するために、反応溶液中に界面活性剤の添加を行うことを検討した。

界面活性剤は下記の5種類について、またそれぞれ添加濃度を0.1~5wt%の範囲で検討を行なった。

- ・ Triton X100
- ・ Tween 20
- ・ Tween 80
- ・ SDS
- ・ サルコシル
- ・

1-4. MPEX反応パラメータ検討

上記までの検討を基に、MPEX反応の試薬類の標準条件を設定。この標準条件に対して、各種パラメータの値を変えて反応性への影響を調べた。

MPEX反応のパラメータとして、

- ・ 反応時間
- ・ 酵素濃度
- ・ dNTP量
- ・ 酵素種類

が挙げられ、これらについて検討した。
また、検討の際の反応温度は37°C一定温度で行なった。

2. 菌を用いたMP EX法による遺伝子検出検討

本検討におけるMP EX反応の操作手順は次の通りである。

(プライマー固定化)

4細菌(大腸菌、黄色ブドウ球菌、サルモネラ菌、緑膿菌)の23S領域に特異的プライマー(ECO、SA、SAL、PA)とポジティブコントロールプライマー(PC)を用いた。それぞれのプライマー配列は表6の通りである。これらは、文献Mitter, G. et al. (J. Clin. Microbiol. 2004 vol.42 1048-1057)を元に合成した。

それぞれのプライマーの5'末端をアミノ修飾したものをを用いた。

プライマーは、最終濃度が10 μMとなるように、2×スポッティング液(住友ベークライト製)と滅菌水を用いて調整した。住友ベークライト製MP EX用基板表面に、上記調整したプライマー溶液をマイクロピペッターを使用して点着させた。この際、1 μL/1スポットとな

るように点着させた。5種類すべてのプライマー溶液を点着後、基板をオーブンに入れ、80°Cで1時間加熱させ、プライマーを基板表面に固定化させた。この操作により、基板表面の活性エステル基とプライマー5'末端のアミノ基が結合する。

(ブロッキング)

基板上の未反応の活性エステル基を不活化するために、ブロッキング液(住友ベークライト製)を用いた。

プライマー固定化済み基板をブロッキング液に5分間室温で浸漬させた後、沸騰水中に2分間浸漬、その後室温の水中に2分間浸漬急冷させることによりブロッキング操作を行なった。沸騰水中に浸漬、急冷させることにより、プライマー鎖を確実にほぐし、プライマー伸長反応における、プライマーとターゲットのハイブリ効率を高めることができる。

その後、エアブローにより、基板に付着している水分を完全に除去した。

(ターゲットサンプル準備)

ターゲットサンプルとして細菌23S領

域で増幅させたPCR産物を使用した。

増幅に使用したプライマーは、上記 Mitter, G らの論文記載の表7に記載の配列を使用した。

PCR反応溶液調整は、表8に記載の処方のものを用いた。

PCRの反応温度条件は、

95°C、5分→(95°C、1分→70°C、2分) × 30→72°C、5分とした。

PCR反応の確認は、ゲル電気泳動で行った。

(MP EX伸長反応)

MP EX伸長反応溶液調製は表 4-B に記載の処方に従って行った。

この溶液を95°Cで7分間加熱し、直後に70°Cにあらかじめ温めておいたMP EX基板上に展開した。展開後すぐに70°Cにあらかじめ温めておいたMP EX用ハイブリカバーを被せることにより、反応溶液を基板上に均一に拡散させた。ハイブリカバーを被せた状態のまま、基板を保湿した状態のタッパーウェア内に入れ密閉し、70°Cで30分間加熱した。

(洗浄工程)

MP EX伸長反応が終了した基板を取り出し、ハイブリカバーをはずした後、

2×SSC、0.1%SDS溶液中で1分間浸漬、0.2×SSC溶液中で1分間浸漬、0.02×SSC溶液中で1分間浸漬させることにより基板を洗浄した。

洗浄後は、エアブローにより水分を除去した。

(ビオチン-アビジン反応)

ビオチンアビジン反応溶液を表3に記載の処方に従って調製した。

このビオチン-アビジン溶液を基板上に展開し、MP EX用ハイブリカバーを被せることにより、反応溶液を基板上に均一に拡散させた。ハイブリカバーを被せた状態のまま、基板を保湿した状態のタッパーウェア内に入れ密閉し、37°Cで10分間加熱した。

(洗浄工程)

ビオチンアビジン反応が終了した基板を取り出し、ハイブリカバーをはずした後、