

反応を利用した、MPEX 法によるマイクロサテライト検出検討を行った。

今回は、合成オリゴ DNA を用いて検討を行った。はじめに4塩基の繰り返しのマイクロサテライトの検出検討から開始したが、比較的容易に、正しい検出が出来た。今回検討中のマイクロサテライトの検出では、正確にプライマーDNA鎖と検体DNA鎖およびレポーターDNA鎖がハイブリダイズする必要があり、ハイブリダイゼーションの正確さは、プライマーの T_m 値によるところが大きい。4塩基の繰り返しでは、1回の塩基の繰り返し数あたりの T_m 値の差が比較的大きいため、比較的容易に、マイクロサテライトの検出が出来たと思われる。

2塩基の繰り返しのマイクロサテライトの検出検討では、 T_m 値の差が小さくなることから、検出が困難になることは予想されていたが、当初の検討では、プライマーのマイクロサテライト部分の繰り返し数に関係なく、全く検出が出来なかった。検出が出来なかった要因の一つは、2塩基では、 T_m 値の差が小さく、検体 DNA とプライマーとのハイブリが正確に出来ていないためと考えられるが、

それだけではなく、酵素反応条件によるところも大きいと考えられる。

耐熱性リガーゼを用い、リガーゼ反応における温度を60℃から80℃に変更し、温度管理を徹底して検討をおこなった。反応操作をハイブリダイゼーションとリガーゼ反応を一緒に行い、反応温度の管理を行う方法と、操作をハイブリダイゼーションとリガーゼ反応に分けて各々温度管理を行ったときのシグナルの出方を比較すると、両者とも正解となる塩基繰り返し数を有するプライマースポットのシグナルが強く、2塩基の繰り返しのマイクロサテライトでも、検出が出来る可能性が示唆された。また、上記温度管理条件により、全体のスポットシグナルの強度分布が若干異なることから、温度条件を検討することにより、検出特異性の向上を図ることが可能であると考えられる。

今回の検討では、MPEX 法の応用によるマイクロサテライトの検出には、温度管理が検出の正確性および再現性の確保には重要であることが判った。本方法によるマイクロサテライト検出を実用化するにおいても、先の MPEX 法の高感度

化・高速化の検討と同様に、PCR チューブによる手法を基板上で行うことが出来る反応システムを確立することが、有効であると考えられる。

E. 結論

MPEX 反応と PCR を同時に行うことにより、ゲノム DNA から短時間に高感度で遺伝子を検出できる方法を確立した。ベッドサイドでの診断に適応すべく、基板のデザイン等を含めた、操作性および信頼性の高いシステムの構築を急ぐ必要がある。

MPEX 法を応用したマイクロサテライトの検出検討を行い、合成オリゴ DNA を用いたモデル系で、アレイによるマイクロサテライトの検出が出来る可能性を確認した。反応温度を含む諸条件の最適化により、検出の信頼性の確保と、さらに実際の生体サンプルでの検出性の検証へと進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kinoshita K, Fujimoto K, Yakabe T, Saito S, Hamaguchi Y, Kikuchi T, Nonaka K, Murata

S, Masuda D, Takada W, Funaoka S, Arai S, Nakanishi H, Yokoyama K, Fujiwara K, Matsubara K, Multiple primer extension by DNA polymerase on a novel plastic DNA array coated with a biocompatible polymer, Nucleic Acids Research 2007, Vol.35, No1 e3
doi: 10.1093/nar/gkl939

2. 学会発表

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1-1. 特許出願

(平成18年度出願)

・特願 2006-161865

「DNA 鎖伸長方法および DNA 鎖伸長用アレイ」

・特願 2006-239912

「DNA 配列の検出方法

・特願 2007 - 18442

「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」

1-2. 特許登録

・特許第 3927580 号

「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」

2. 実用新案登録

なし

3. その他

3-1. 意匠登録

・マイクロアレイ用基板

(01293661号)

・マイクロアレイ用基板

(01293662号)

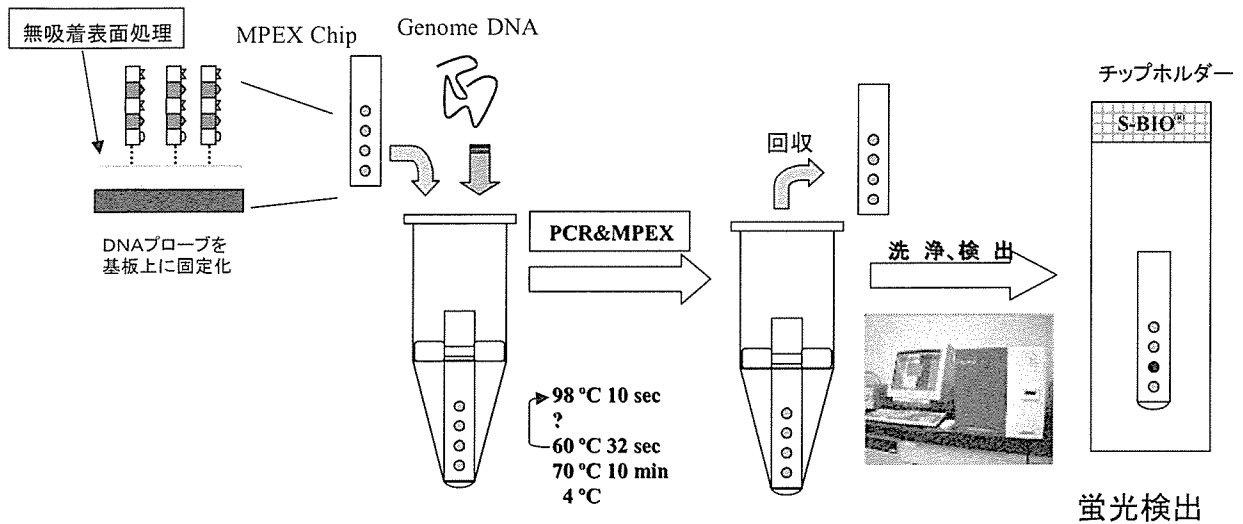


図1. ミニチップによるMPEXとPCR同時反応の操作の流れ

PCR用チューブ内に収まるミニチップ上にMPEXプライマーを固定し、PCR用チューブ内にミニチップを入れ、サンプルDNA、PCRプライマーと共にヒートサイクルをかけた後、ミニチップを取り出し、蛍光などでスポットの検出を行う。

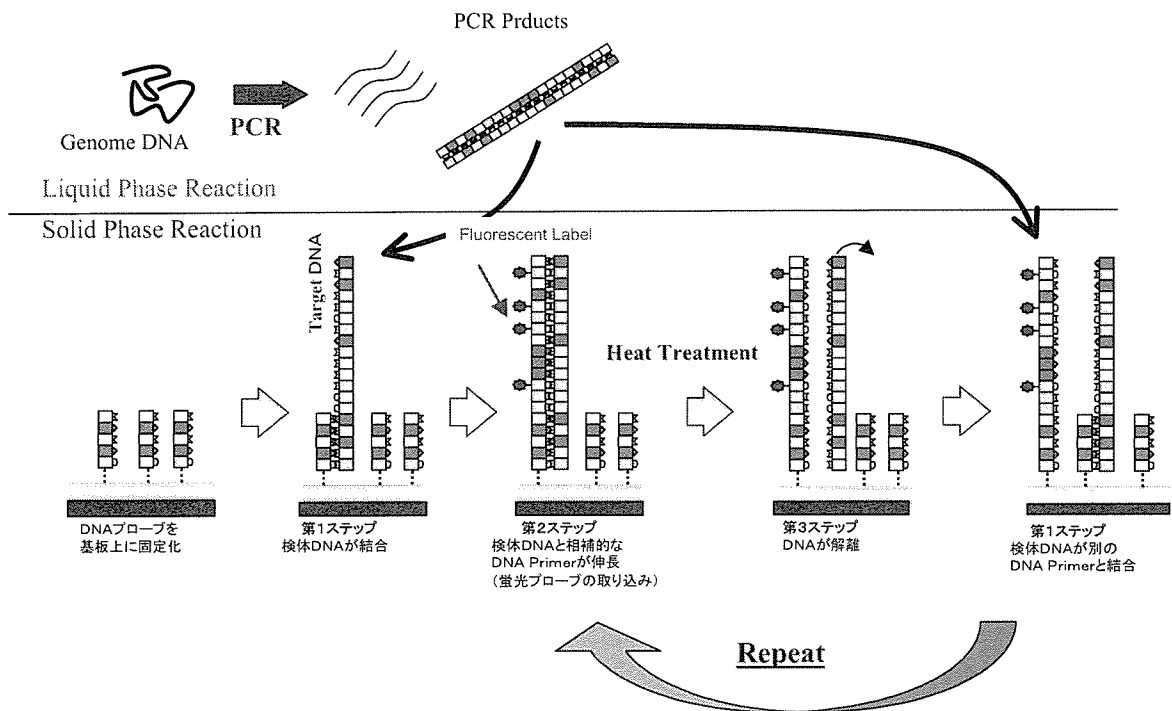


図2. MPEXとPCR同時反応の概念図

液相中ではPCRによる増幅反応が起こり、増幅したPCR産物が鋳型となり固相においてMPEX反応が起こる。MPEX反応で鋳型となったPCR増幅産物はヒートサイクルにより、次のMPEX反応における鋳型となる。

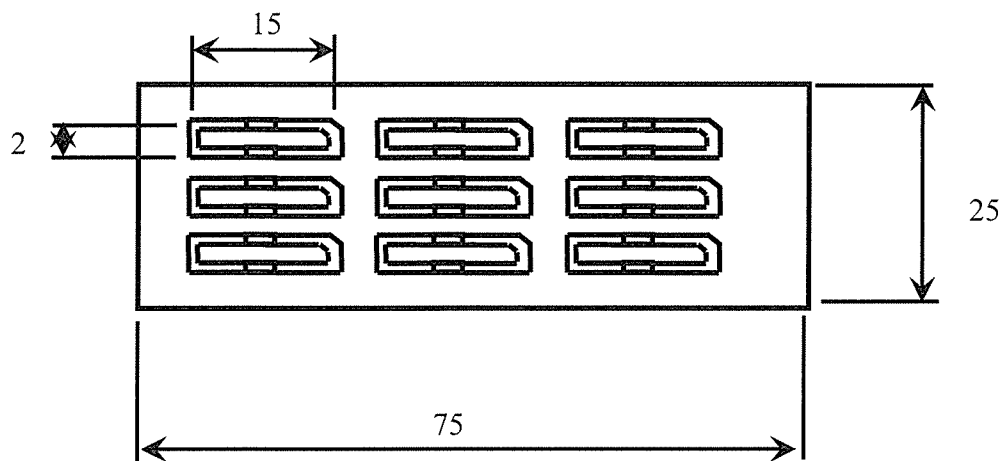


図3. ミニチップ仕様

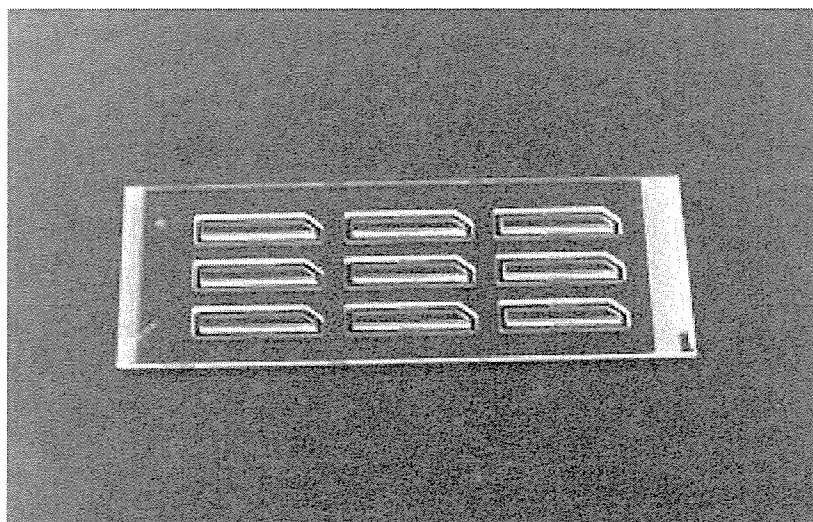


図4. 作製したミニチップ

プラスチック製DNAマイクロアレイ用基板に切削加工を施しミニチップを作製した。

表1 大腸菌検出に使用したプライマー

プライマー	塩基配列
E.coli MPEX Primer	NH-C6-5'-CTGATATGTAGGTGAAGCGACTTGCTCG-3'
PCR Primer set 1	
Forward	5'-GCAAAATGGTGCCGTA ACTT-3'
Reverse	5'-GCCAGCTGGTATCTTCGACT-3'
PCR Primer set 2	
Forward	5'- GACAGCCAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGC -3'
Reverse	5'-GGAATTTTCGCTACCTTAGGAYSGTTATAGTTACS-3'

PCR Primer set 1でのPCR増幅産物の塩基長は99bpであり、PCR Primer set 2のPCR増幅産物の塩基長は800bpである。

表2. 大腸菌検出での反応溶液条件

	条件A	条件B
Taq(5U/ μ L)	1	1
Taq buffer	2	2
dATP,dCTP,dGTP Mixure (1mM each)	0.4	0.4
dTTP(1mM)	0.12	0.12
Cy3-dUTP(0.1mM)	2.6	0.26
Forward Primer	0.13	0.13
Reverse Primer	0.13	0.13
Total DNA (E. coli genome DNA)	1	1
H2O	12.62	14.96
Total	20	20

Cy3dUTPの添加量を変えて、検討を行った。

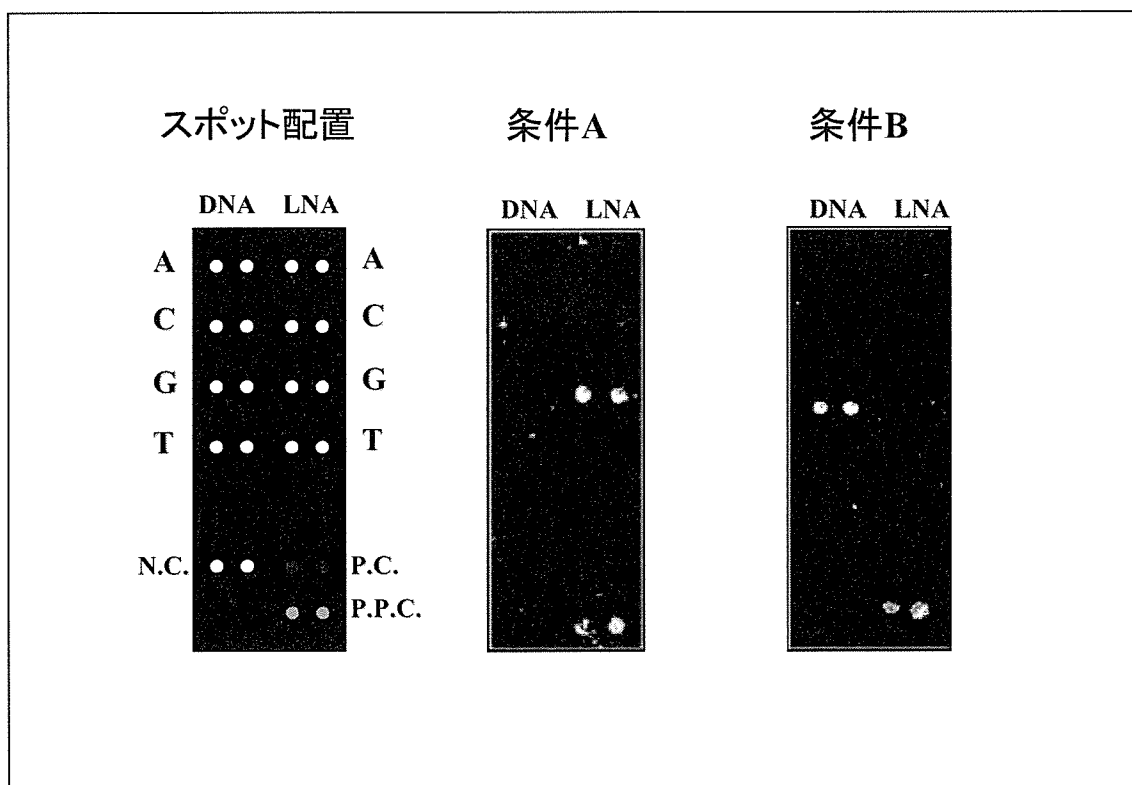


図5. PCR-MPEX同時反応法による大腸菌の検出
 (99bpでの特定部位を切り出すプライマーセットを使用した場合)
 Cy3-dUTP濃度が高い条件Aでは3'末端にLNAを導入したプライマーで特異的にシグナルが検出され、Cy3-dUTP濃度が低い条件Bでは、ノーマルなオリゴDNAプライマーで特異的にシグナルが検出された。

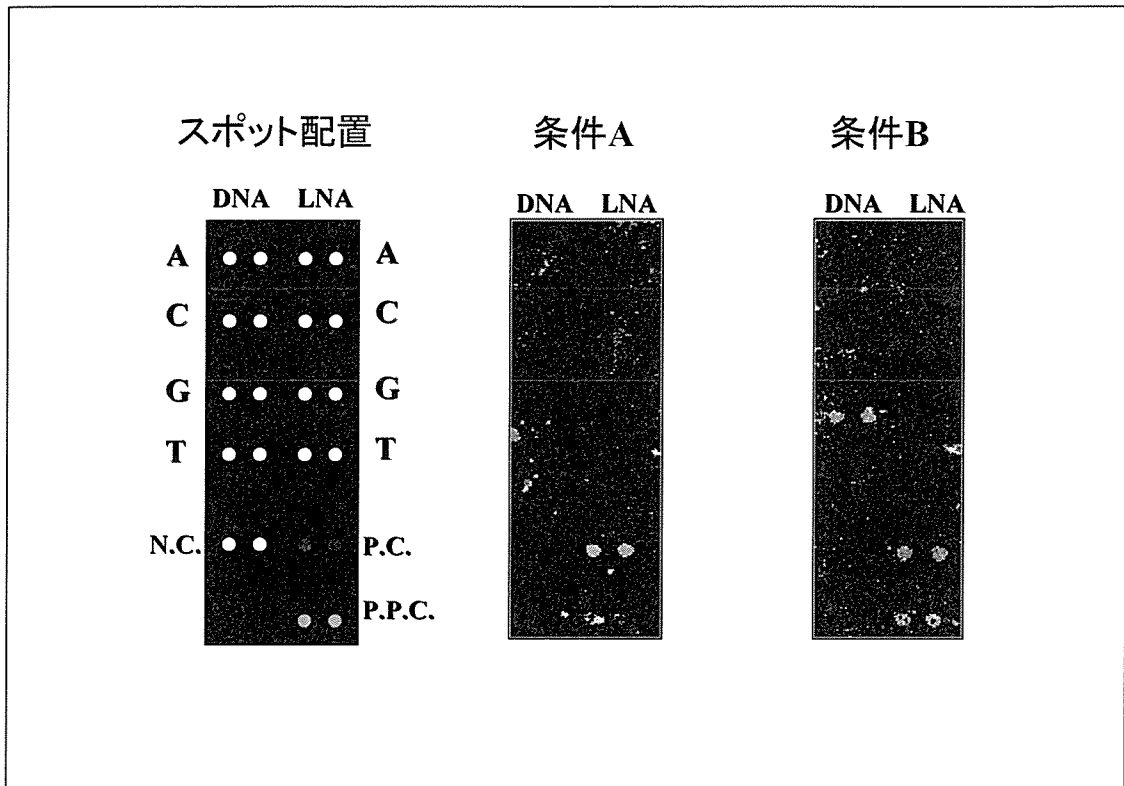


図6. PCR-MPEX同時反応法による大腸菌の検出
(800bpでの特定部位を切り出すプライマーセットを使用した場合)

Cy3-dUTP濃度が高い条件Aでは3'末端にLNAを導入したプライマーでも特異的にシグナルが検出されなかった。Cy3-dUTP濃度が低い条件Bでは、ノーマルなオリゴDNAプライマーで特異的にシグナルが検出された。

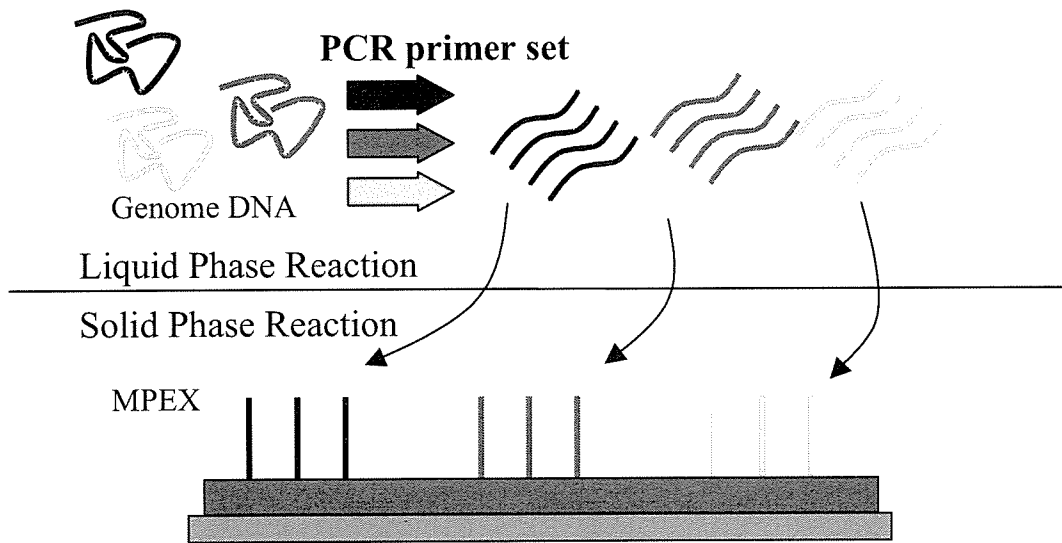


図7. PCR-MPEX同時反応法でのマルチPCRプライマーセット使用による複数遺伝子同時検出概念図

表3 3菌種同時検出に使用したプライマー

菌種	プライマー	塩基配列
大腸菌 (O-157)	detect primer (MPEX primer)	5'-NH ₂ -aacgccgataccattacttataccgac-3'
	F primer	5'-ggcggattagacttcggcta-3'
	R primer	5'-cgtttggcactatttgccc-3'
サルモネラ菌 (SAL)	detect primer	5'-NH ₂ -acaagaagccctgagcggcgc-3'
	F primer	5'-gtcacggaagaagagaaatccgtacg-3
	R primer	5'-gggagtccaggtgacggaaaattt-3
リステリア菌 (Lis)	detect primer	5'-NH ₂ aaatcatcgacggcaacctcgga-3'
	F primer	5'-cggaggttccgcaaaagatg-3'
	R primer	5'-cctccagagtgatcgatgtt-3'

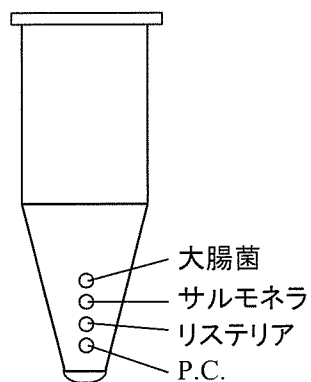


図8. PCR用チューブへの
MPEXプライマーのスポット配置

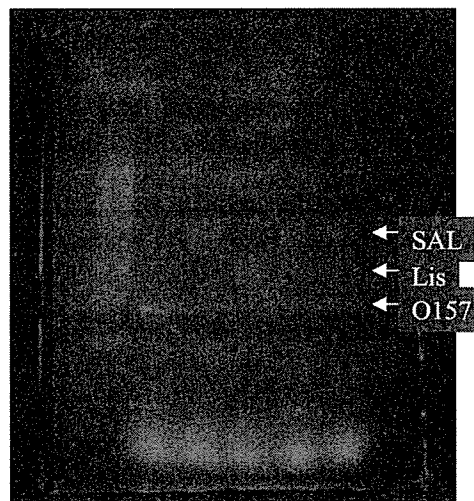
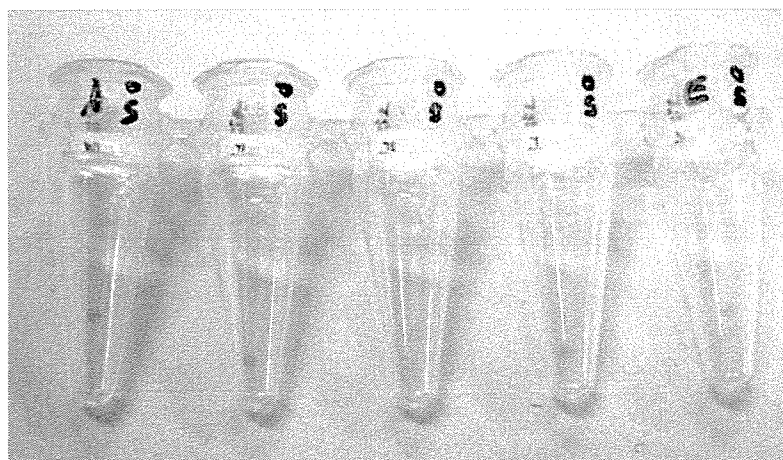


図9. PCR増幅産物の電気泳動
各PCRプライマーにより遺伝子が
増幅されていることを確認した。



O-157 SAL Lis SAL
+
Lis O-157
+
SAL
+
Lis

図10. 複数の菌の検出

加えた菌由来のゲノムDNAに特異的にスポットが検出された。

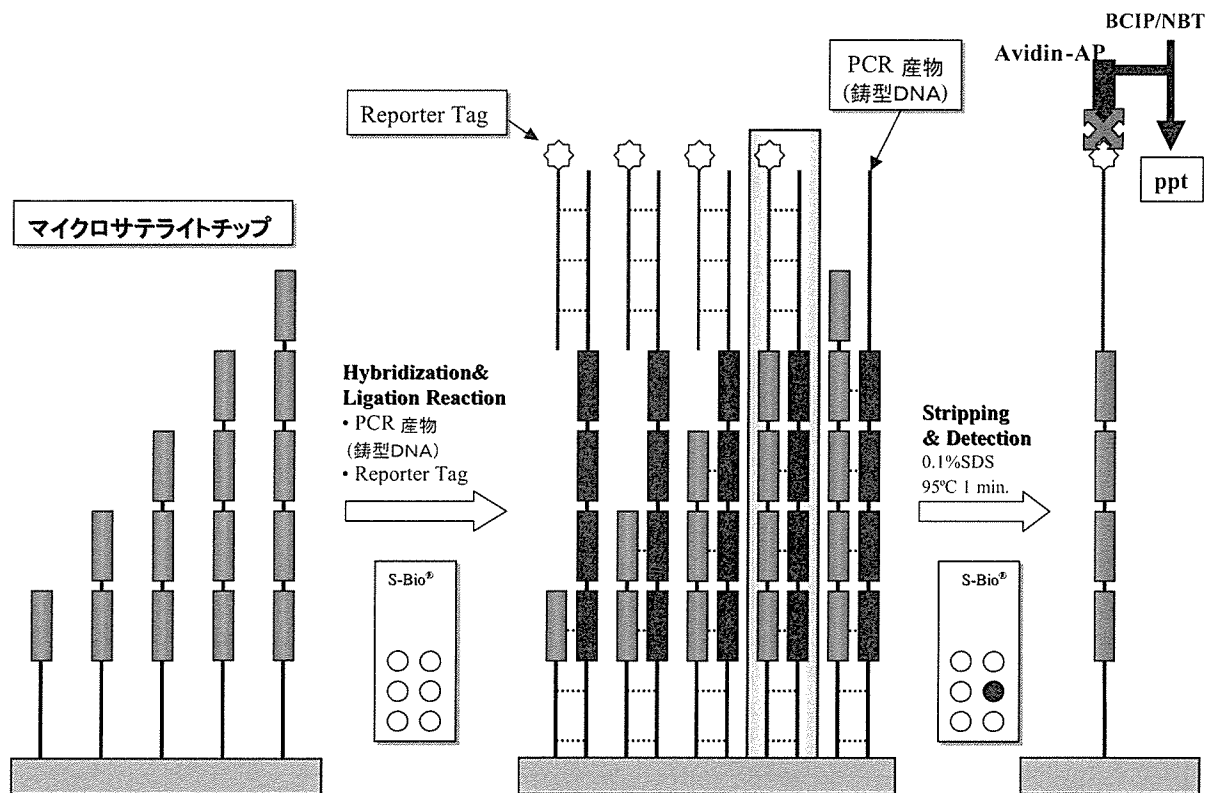


図11. MPEX法によるマイクロサテライト検出概念図

基板上にマイクロサテライトの塩基繰り返し部分を有するプライマーを固相化し、溶液中には、検出対象となる鋳型DNAとい標識を施したレポーターとなるオリゴDNAを加える。レポーターオリゴDNAは、マイクロサテライトに隣接する配列からなり、検体DNAのマイクロサテライトの塩基繰り返し数とプライマーの塩基繰り返し数が一致したときのみ、プライマーとレポーターオリゴDNAの連結が起こり、そのプライマーにだけ標識が施され、シグナルとして検出される。

表4. 4塩基繰り返しマイクロサテライト検出モデル塩基配列

	塩基配列
3 repeat	GATGGATGGATAGATAGATA
↓	↓
10repeat	GATGGATGGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATATAGAGATAGATA
template	TGTGTGCGCATATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCCATCCATC
reporter	phosphate-GATAGATAGATAGATAGATATGCGCACACA-3'-Biotin

表5. 2塩基繰り返しマイクロサテライト検出モデル塩基配列

	塩基配列
7 repeat	GTGTGTGTGCGTGCGTG TGTGTGTGTGTGT
↓	↓
18repeat	GTGTGTGTGCGTGCG TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
template	GAGCCAGGATGGAGACCAAAACCGCACGCACACACAC
reporter	phosphate- GTGTGTGTGT TTTTGGTCTCCATCCTGGCTCA-3'-Biotin

表6. マイクロサテライト検出検討における各溶液の処方

溶液A	volume
ligase (5u/uL)	0.05
10 × ligase buffer	8
formamide (50%)	16
H2O	39.95
total volume	64

溶液B	volume
target DNA template (100nM)	8
reporter DNA (100nM)	8
total volume	16

溶液C	volume
SA-Cy3 (ng/uL)	0.1
PBS	71.9
BSA(3%)	8
total volume	80

溶液D	volume
ligase (1u/uL)	1
10 × ligase buffer	8
formamide (50%)	8
target DNA template (100nM)	8
reporter DNA (100nM)	8
H2O	63
total volume	80

溶液E	volume
10 × ligase buffer	8
formamide (50%)	8
target DNA template (100nM)	8
target DNA template (100nM)	8
H2O	64
total volume	80

表7. マイクロサテライト検出プロトコール

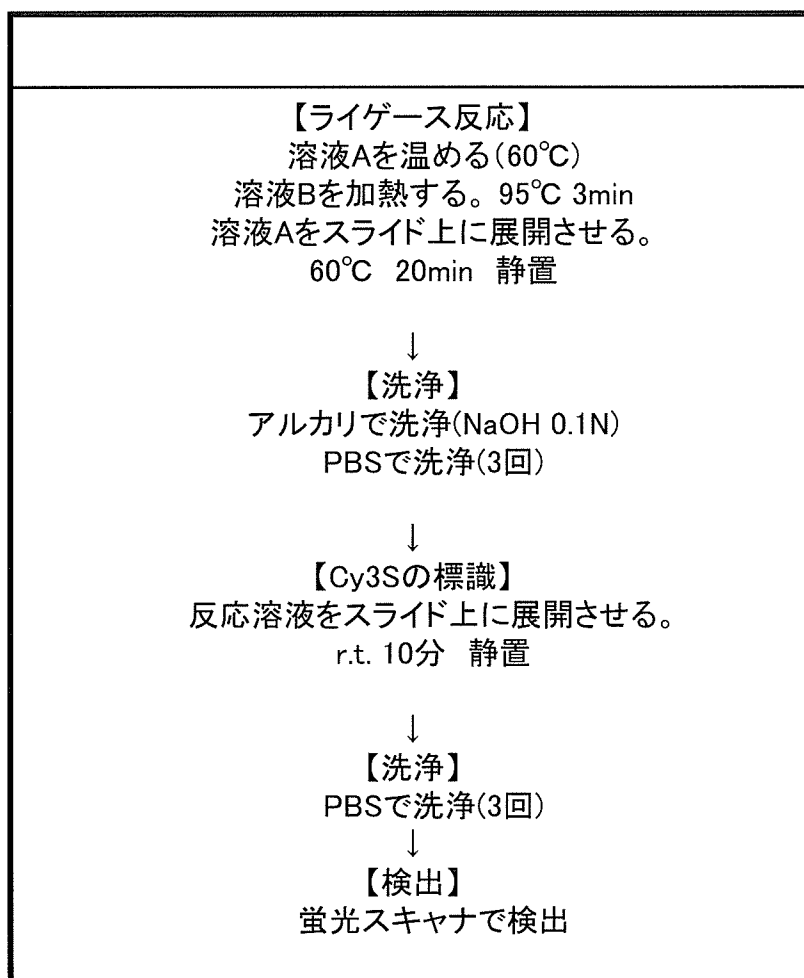


表8. マイクロサテライト検出温度管理検討のためのプロトコール

条件1	条件2
<p>【ライゲース反応】 スライドを温める(80℃) 溶液Dを加熱する。95℃ 1min 反応溶液をスライド上に展開させる。 80℃ 20min 静置</p>	<p>【ハイブリダイゼーション】 スライドを温める(80℃) 溶液Bを加熱する。95℃ 1min 溶液Bをスライド上に展開させる。 80℃ 60min 静置 ↓ 【洗浄】 PBSで洗浄(3回) ↓ 【ライゲース反応】 スライドを温める(80℃) 溶液Eを加熱する。95℃ 1min 溶液Eをスライド上に展開させる。 80℃ 20min 静置</p>
<p>↓ 【洗浄】 アルカリで洗浄(NaOH 0.1N) PBSで洗浄(3回) ↓ 【Cy3Sの標識】 反応溶液をスライド上に展開させる。 r.t. 15分 静置 ↓ 【洗浄】 PBSで洗浄(3回) ↓ 【検出】 蛍光スキャナで検出</p>	

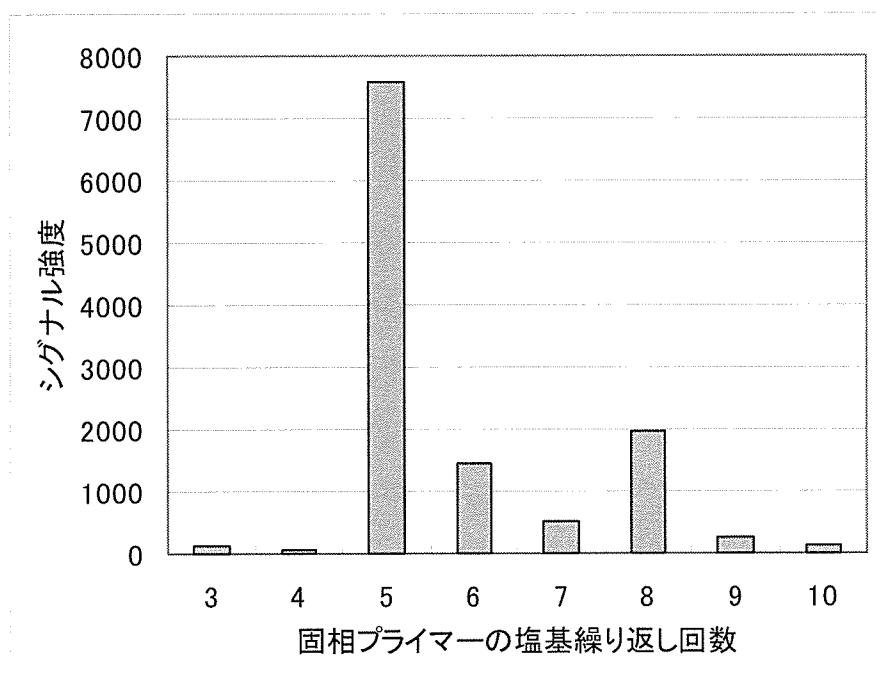


図12. 4塩基繰り返しマイクロサテライトの検出

本実験においてシグナルとして検出されるべきプライマーは、5回繰り返しのものであるが、5回塩基繰り返しを有するプライマーにおいて、顕著にシグナル強度が高くなった。

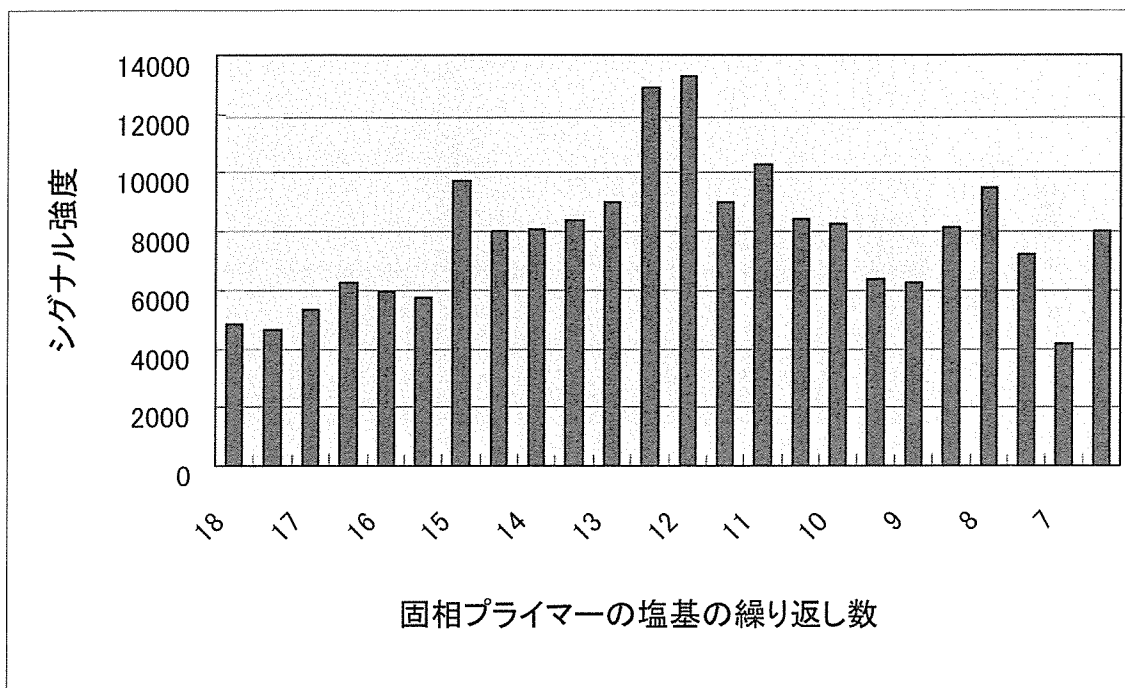


図13. 2塩基繰り返しマイクロサテライトの検出

本実験においてシグナルとして検出されるべきプライマーは、12回繰り返しのものであるが、60℃でのリガーゼ反応では、特異的なシグナルの検出が出来ていない。