

伝子のプライマー及びプローブを Primer Express 3 software (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて設計し、設計したオリゴ DNA は北海道システムサイエンスで合成した。リアルタイム PCR は、Applied Biosystems 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems) 及び SDS software v1.3 を用いて行った。20 μ l の反応液中には、1 \times Premix ExTaq (Takara, Shiga, Japan)、600 or 800 nM プライマー、100 nM Taqman プローブ及び希釈したゲノム DNA を添加した。95 $^{\circ}$ C 10 秒後 35 サイクル (95 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 35 秒) で増幅した。WGA を用いた増幅時の偏りを測定するために、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を適用した。

マイクロアレイプローブの設計と作成

マイクロアレイにスポットしたオリゴ DNA は、Array Designer 3.01 (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA) を用いて設計し、塩基配列は表 2 に示した。オリゴ DNA の設計条件は、60 mer、 T_m 75 $^{\circ}$ C \pm 5.0 $^{\circ}$ C、hairpin loops (<-3.0 kcal/mol) 及び self-dimer (<-3.0 kcal/mol)、クロスホモロジーを避けた。但し *F. tularensis* を標的としたオリゴ DNA は、*F. philomiragia* とはハイブリしないように設計した。

本研究で設計したマイクロアレイプローブの DNA 合成及びマイクロアレイ作成は、北海道システムサイエンス (Hokkaido, Japan) に委託した。100 μ M の 5' アミノ化されたオリゴ DNA は、GeneSlide (Toyokohan Co., Tokyo, Japan) 上スポットした。ポジジョンコントロールとして、Cy3 及び Cy5 でラベルした AHR オリゴ DNA を 10 μ M の濃度でスポットした。スポットされたスライドは、80 $^{\circ}$ C で 1 時間固定化処理した後、0.5% SDS を含む 2 \times SSC 溶液で洗浄した。洗浄後のスライドは、0.5% SDS を含む 2 \times SSC 沸騰溶液で 10 分間処理した後、DW でリンス

し遠心乾燥した。

マイクロアレイのハイブリダイゼーションとデータ解析

サンプルのラベル化処理前に、DOP-PCR 又は Phi29 DNA ポリメラーゼ増幅由来の産物は、RsaI 及び AluI 処理を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間断片化処理を行った。一方 OmniPlex WGA 由来の産物は、400~1000bp 程度だったので断片化処理は行わなかった。増幅産物は、フェノール/クロロホルム処理を行った後エタノール沈殿を行い、その沈殿物は 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl 溶液に溶解した。得られた 2~10 μ g のサンプルは、Ulysis Alexa Fluor 660 Nucleic Acid Labeling Kit (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) を用いてラベル化処理を行った。ラベル化処理を行ったサンプルは、エタノール沈殿を行い DW に溶解した。2 μ g のラベル化サンプルは、95 $^{\circ}$ C で 3 分間変性処理を行い、500 μ l のハイブリダイゼーションバッファー (終濃度: 4 μ g/ml 増幅産物、6 \times SSC、5 \times Denhardt's solution、50 mM sodium phosphate、0.5% SDS、及び 20% formamide) に調整した。450 μ l (1.8 μ g サンプル) のハイブリダイゼーション溶液はガスケットスライド (Agilent) の上に拡げ、マイクロアレイスライドと張り合わせた。ハイブリダイゼーションは Hybridization Oven (Agilent) を用いて 50 $^{\circ}$ C で一晩行った。ハイブリダイゼーション後のスライドは、0.5% SDS を含む 2 \times SSC で 50 $^{\circ}$ C 5 分間 2 回洗浄した後 DW でリンスした。遠心乾燥したスライドは、100% 出力の赤色レーザー (633 nm; Alexa 660 and Cy5)、80% PMT、解像度 10 μ m の設定でスキャンした。得られた画像ファイルは、ScanArray Express software (Perkin Elmer) にて解析を行った。

C. 研究結果

WGA 法によるゲノム DNA の増幅

マイクロアレイを用いた検出法で必要とされる DNA 量 (1 μg 以上) を確保するために、4 種類の WGA 法 (DOP-PCR、Phi29 v1、Phi29 v2、OmniPlex WGA) の増幅効率を比較検討した。4 種類の WGA の増幅効率を評価するために、10 ng の *F. tularensis* 及び *E. coli* 由来のゲノム DNA を鋳型として用いて、各 WGA を行った (図 1)。*F. tularensis* を鋳型として用いた時、DOP-PCR では 3.3 μg 、Phi29v1 では 2.6 μg 、Phi29v2 では 1.5 μg 、OmniPlex では 1.5 μg の増幅産物が得られた。同様に、*E. coli* を鋳型として用いたときには、2.4 μg から 5.1 μg の産物が得られた。Phi29 v1 において鋳型 DNA を添加していない反応溶液で、増幅産物が観察された。この現象は過去にも報告されており、プライマー重合による非特異反応だと考えられた。ただし Phi29 v2 において、鋳型を添加しない場合では非特異反応は観察されず、非特異反応は抑制されていた。4 種類の WGA について、サンプル DNA から得られる差物量にばらつきが見られるものの、全ての WGA で 1 μg 以上の増幅産物が得られることを確認した。4 種類の WGA 法では、マイクロアレイサンプルとして必要な増幅効率を有していた。

各 WGA 法を用いて増幅反応を行った時の増幅産物のサイズを確認した (図 2)。各 WGA 法の反応溶液の一部を採取しアガロースゲル電気泳動を行った。DOP-PCR を用いた増幅法では、ゲノムの一部が不均一に増幅されたラダー状のバンドが 100bp~3kbp にわたって観察された。Phi29 DNA ポリメラーゼを用いた方法では、*F. tularensis* 及び *E. coli* 由来のゲノム DNA を均一に増幅しているスメア状のバンドが 1~10kbp 以上に渡って検出された。OmniPlex WGA 法では、予めゲノム DNA を断片化した後に増幅する

為 0.5~2kbp の均一に増幅されたスメアが検出された。これらの結果から、DOP-PCR はゲノム DNA を偏って増幅していると推測された。Phi29 v1、Phi29 v2、OmniPlex WGA 法による増幅では、ゲノム DNA を均一に増幅している事が考えられた。

増幅時の偏りの検証

4 種類の WGA による増幅時の偏りについて検証するにあたり、リアルタイム PCR の $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法を用いた。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法では、リアルタイム PCR の反応系における増幅効率を 100% と仮定して、特定の遺伝子に対する各遺伝子の相対含量を測定する。そこで、本研究で設計したリアルタイム PCR 用のプライマー及び Taqman プローブの増幅効率 (Efficiency) が $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法を適応できる水準にあるかを検討した (図 3)。この結果全ての反応系で、約 100% の増幅効率が確認された。そこで、これらのプライマーと Taqman プローブを用い、4 種類の WGA 法による増幅産物中に、*F. tularensis* の *sdhA* 及び *atpA* 遺伝子又は *E. coli* の *ybdG* 及び *yedS* 遺伝子の *gapA* 遺伝子に対する含有相対比を測定した (図 4)。DOP-PCR の増幅産物では、Phi29 DNA ポリメラーゼ又は OmniPlex WGA 法を用いた増幅法よりも顕著に増幅の偏りが検出された。DOP-PCR で検出された偏った増幅は、用いた 6MW プライマー (5' -CCGACTCGAGNNNNNATGTGG-3') の 3' 末端には 6 塩基の半特異的な塩基配列に依存しているためと考えられた。6MW プライマーの 3' 末端の 6 塩基から形成されている半特異的塩基配列は、哺乳類ゲノム DNA では出現頻度が高いが、一部のバクテリアゲノム DNA では出現頻度が低いことが報告されている。これらの結果から、マイクロアレイを用いた病原体検出には DOP-PCR の適用し難く、Phi29 DNA ポリメラーゼ又は OmniPlex WGA 法の適応を念頭に置

き以降の実験を進めた。

病原体を検出するためのマイクロアレイのプロトタイプ

病原体を検出するためのマイクロアレイを作成するにあたり、簡易的に2種類のバクテリア *F. tularensis* 及び *E. coli* を標的とした。2種類のバクテリアから Array Designer でマイクロアレイプローブを作りやすい遺伝子を抽出し、60塩基、 T_m 75°C ± 5°Cで設計した(表2)。設計したマイクロアレイプローブは、BLAST検索にて、他のバクテリアとホモロジーが無いことを確認した。ただし、*F. tularensis* は同種の *F. philomiragia* とクロスハイブリしないように作成した。設計したマイクロアレイプローブは、ポジションコントロール及びネガティブコントロールと共に、図5に示したレイアウトでスポットした。

WGA産物のマイクロアレイへの反応性

10 ngのゲノムDNAは、4種類のWGA法にて増幅後、Alexa Fluor 660でラベル化した。1.8 µgのラベル化サンプルはマイクロアレイにハイブリさせ、スキャン画像を図6に示した。その結果、OmniPlex WGA法による増幅産物は、*F. tularensis* 及び *E. coli* の鋳型に対応する特異的な16遺伝子のスポット (Feature) が全て均一に強く検出された。Phi29 DNAポリメラーゼによる増幅産物は、OmniPlex WGA法による増幅産物よりも検出シグナルが弱く、不均一なシグナルで検出された。シグナルが弱くなる原因として、Phi29 DNAポリメラーゼではランダムヘキサマー (5'-NNNNNN-3') を用いるため、ランダムヘキサマー重合による増幅産物量の水増しされ、標的遺伝子に対する増幅産物量比が減少していると考えられる。DOP-PCRの産物をマイクロアレイに適用した場合、検出シグナルが弱く、遺

伝子によって激しいシグナルの偏りが生じていた。

DOP-PCR増幅産物の偏りが、マイクロアレイの蛍光強度(図6)とリアルタイムPCRで検出された増幅の偏りの値 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$, 図4)との相関を各遺伝子について観察した(図7)。その結果、重決定係数 (R^2) は0.992を示し強い相関が観察され、DOP-PCR産物のマイクロアレイで検出される蛍光強度のバラつきは、各遺伝子の増幅量の差に依存していると推測された。DOP-PCR以外のWGA法において、マイクロアレイで検出されるシグナルの偏りと、増幅時の偏りとの相関は観察されなかった。

マイクロアレイを用いた *F. tularensis* 種の検出

本研究で使用したマイクロアレイは *F. tularensis* subsp. *tularensis* strain schu をレファレンス株として設計し、*F. tularensis* 株が全て検出できるように作成した。そこで、*F. tularensis* の5株及び *F. philomiragia* の1株のゲノムDNAをOmniPlex WGA法にて増幅し蛍光ラベル化後、マイクロアレイにハイブリさせた(図8)。その結果、設計当初の目的どおりに *F. tularensis* の5株は、マイクロアレイで検出可能であった。一方、*F. philomiragia* 029株は *F. tularensis* を検出するためのマイクロアレイプローブとは反応しなかった。

F. tularensis に対する患者血清は、*Brucella* 属バクテリアと交差反応を時折起こすことが知られている。そこで、本研究で作成したマイクロアレイと *Brucella* 属するバクテリアゲノムDNAサンプルとのクロスハイブリを検証した。この結果、このマイクロアレイでは、他属バクテリアサンプルとクロスハイブリ可能性が低いことが示唆された。以上の結果から、本研究におけるマイクロアレイを用いた検出では、

非特異反応は検出されなかった。

食品中に含まれる病原体を検出するためのマイクロアレイの開発

F. tularensis 及び E. coli を標的としたマイクロアレイでは、各バクテリアを特異的に検出可能であった。この設計方法を踏襲し、鳥インフルエンザウイルス HA 及び NA 遺伝子を型別に検出するマイクロアレイプローブを設計した (表 3、4)。60 塩基のマイクロアレイプローブは、約 92~95% 以上ホモロジーを有している相補鎖と反応することが知られている。そこで、鳥インフルエンザウイルスの HA 及び遺伝子を標的としたマイクロアレイプローブは、全て BLAST 検索を行い、その結果を The Influenza Sequence Database

(<http://www.flu.lanl.gov/>) に登録されている鳥インフルエンザ株と Accession number で関連付け総当たりで調査した (図 10、11 及び表 5、6)。60 種類の HA 遺伝子を標的としたマイクロアレイプローブは鳥インフルエンザウイルスに対して 96% の検出網羅率を示し、40 種類の NA 遺伝子を標的としたマイクロアレイプローブは 98% の検出網羅率を示した。

D. 考察

4 種類の WGA について、バクテリアのゲノム DNA から得られる差物量にばらつきが見られるものの、全ての WGA で 1 µg 以上の増幅産物が得られることを確認した。4 種類の WGA 法では、マイクロアレイサンプルとして必要な増幅効率を有していた。しかし、リアルタイム PCR を用いた増幅時の偏り検証の結果、DOP-PCR はゲノム DNA を偏って増幅していると推測された。DOP-PCR についてプライマー濃度の検討、ポリメラーゼの変更、プログラムの変更等の検討を行ってみたが、増幅時の偏りが見られた。

さらに DOP-PCR における増幅時の偏りは、マイクロアレイに反映していた。Phi29 v1、Phi29 v2、OmniPlex WGA 法による増幅では、ゲノム DNA を均一に増幅している事が考えられた。マイクロアレイにおける検出では、OmniPlex WGA 法による増幅産物が標的遺伝子に対するシグナル強度及び、シグナルの均一性に優れていた。以上の結果より、マイクロアレイに最適なゲノム DNA の増幅法は、OmniPlex WGA 法であることが示唆された。

標的とした遺伝子がマイクロアレイにて特異的に検出できることが確認されたので、鳥インフルエンザを検出するためのマイクロアレイプローブの設計も行った。更に、ノロウイルス、ロタウイルス、ニューキャスルウイルス、E 型肝炎ウイルス、ペロ毒素遺伝子等の食品に含まれ得る病原体等を検出するためのマイクロアレイプローブを設計中である。今後これらのウイルスやバクテリア等を検出するためのマイクロアレイプローブの設計・作成及び特異性の検証を行う。また、食品サンプルには病原体以外にも食品の核酸が大量に含まれているので、病原体の核酸のみを効率良く増幅する手法の確立を行う。

E. 結論

病原体を検出するためのマイクロアレイに適切な核酸増幅法は、OmniPlex WGA 法である。マイクロアレイを用いれば、特異的に標的病原体核酸を検出できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

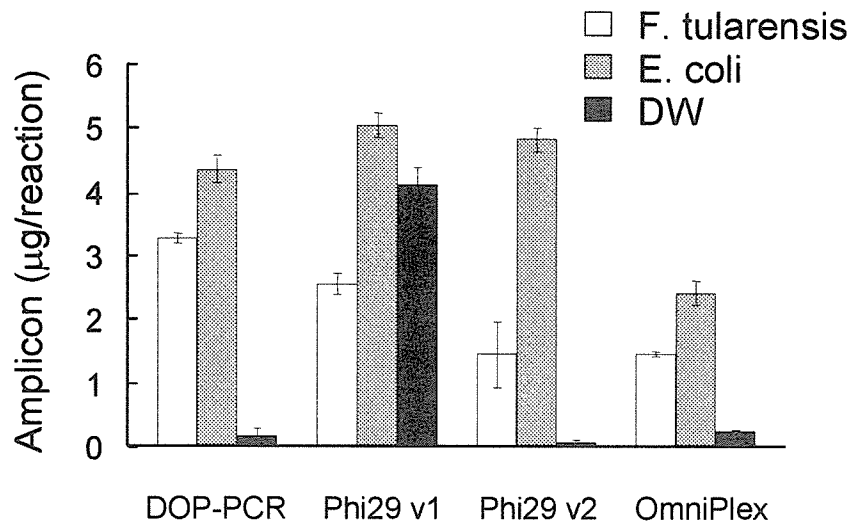


図1 各種WGA法による増幅産物の定量。F. tularensis及びE. coliから抽出した10 ngのゲノムDNAを鋳型として用いて、各WGA法を用いて増幅した産物を定量した。各々の実験は3連で行い、得られた平均産物量と標準誤差(SE)を示した。

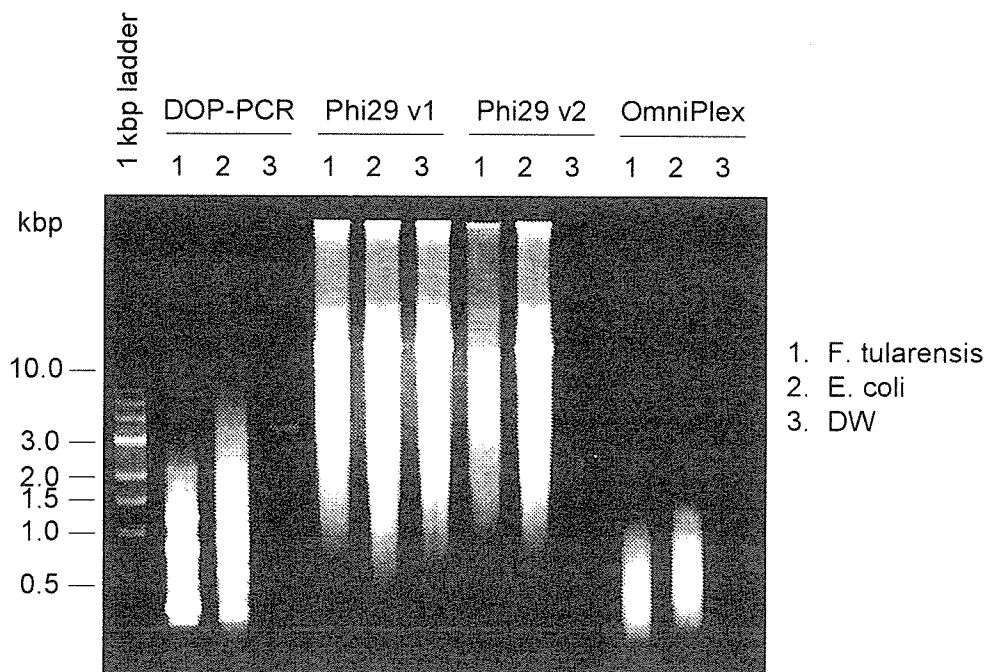


図2 WGA法による増幅産物サイズの確認。F. tularensis及びE. coliから抽出した10 ngのゲノムDNAを鋳型として用いて、各WGA法の増幅産物を電気泳動を行った。

表1 リアルタイムPCRに使用したプライマー

Name	Position	Length	Tm	Final conc. (μM)	Sequence
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> schu4 (NC_006570)					
ATP synthase subunit A: atpA (FTT0062) / amplicon size: 129bp					
Ft/atpA-F	787	25	58	0.6	5'-TTGACTAAACAAGCATGGGCTTATA-3'
Ft/atpA-P	835	27	69	0.6	5'-FAM-AGACCGCCTGGACGTGAAGCTTATCCT-Tamra-3'
Ft/atpA-R	915	24	59	0.1	5'-GTTGACTCTTGCAGCTCTTTCAAG-3'
succinate dehydrogenase, catalytic and NAD/flavoprotein subunit: sdhA (FT0074) / amplicon size: 76bp					
Ft/sdhA-F	379	24	58	0.8	5'-GGGATGTCAAGGAACTATGATCCT-3'
Ft/sdhA-P	404	29	69	0.8	5'-FAM-CTAATCAAGCAGAAAGAAGCTTGCAGCA-Tamra-3'
Ft/sdhA-R	454	19	59	0.1	5'-GAGCATGCCCGTCCATC-3'
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: gapA (FT1368c) / amplicon size: 108bp					
Ft/gapA-F	579	27	58	0.6	5'-TGCATATACAGGTGACCAAAATACTTT-3'
Ft/gapA-P	608	28	70	0.6	5'-FAM-ATGCTCCTCATGCGAAAAATGACTTCCG-Tamra-3'
Ft/gapA-R	686	24	59	0.1	5'-GCAGCACCAGTTGAGTTAGGTACA-3'
<i>Escherichia coli</i> K12 (NC_000913)					
putative outer membrane protein: ycdS (b1024) / amplicon size: 75bp					
Ec/ycdS-F	724	20	59	0.6	5'-CCTACGCGCAGTGAAAGTGA-3'
Ec/ycdS-P	754	19	69	0.6	5'-FAM-ATTGCCGATCGCGCCCTCG-Tamra-3'
Ec/ycdS-R	798	25	60	0.1	5'-CAGAATTTCTAATGCAGCGTATTGG-3'
putative fimbrial-like protein: ybgD (b0719) / amplicon size: 69bp					
Ec/ybgD-F	192	21	59	0.6	5'-CCGGGAGCATCATAGCAATAA-3'
Ec/ybgD-P	215	23	69	0.6	5'-FAM-TGGCCGTCGACATTCGCTTGATC-Tamra-3'
Ec/ybgD-R	260	22	59	0.1	5'-TCAGAAGCAGGCAGATCACAGT-3'
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: gapA (b1779) / amplicon size: 78bp					
Ec/gapA-F	20	20	59	0.6	5'-TCAACGGTTTTGGCCGTATC-3'
Ec/gapA-P	42	24	69	0.6	5'-FAM-TCGCATTGTTTTCCGTGCTGCTCA-Tamra-3'
Ec/gapA-R	97	22	60	0.1	5'-TGATTGCAACGATCTCGATGTC-3'

-F: Forward primer, -R: Reverse primer, -P: Taqman probe.

プローブは、5'末端に6-carboxy-fluorescein (FAM)及び3'末端にquencher (Tamra)ラベルした。プライマー及びプローブは、Primer Express softwareを用いて設計した。

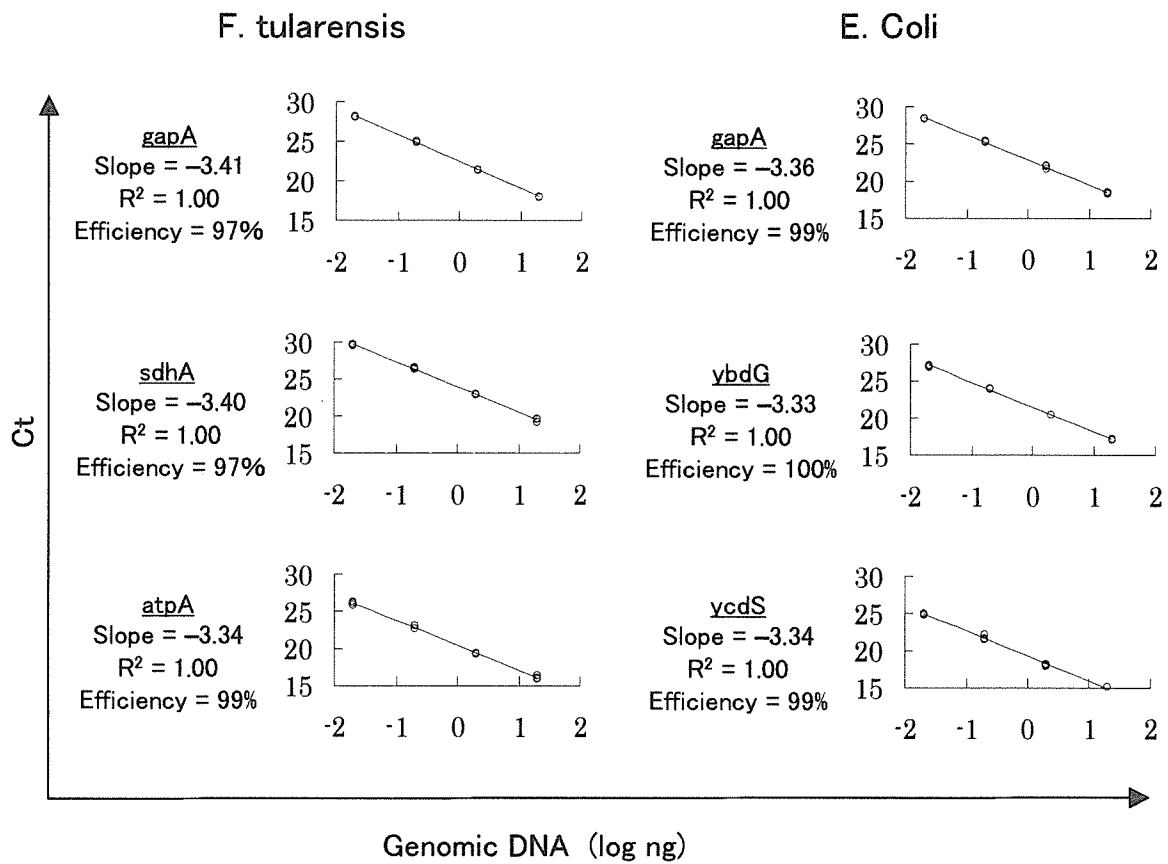


図3 リアルタイムPCRの増幅効率。WGAによる増幅の偏りを $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法で検証を行うにあたり、プライマーとTaqmanプローブを用いた増幅効率の測定を行った。F. tularensis及びE. coliのゲノムDNAを20ng~2pgまで10倍段階希釈した鋳型を用いて、リアルタイムPCRを行った。増幅効率(Efficiency)は、 $(10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ として算出した。本試験での増幅効率は、約100%だった。

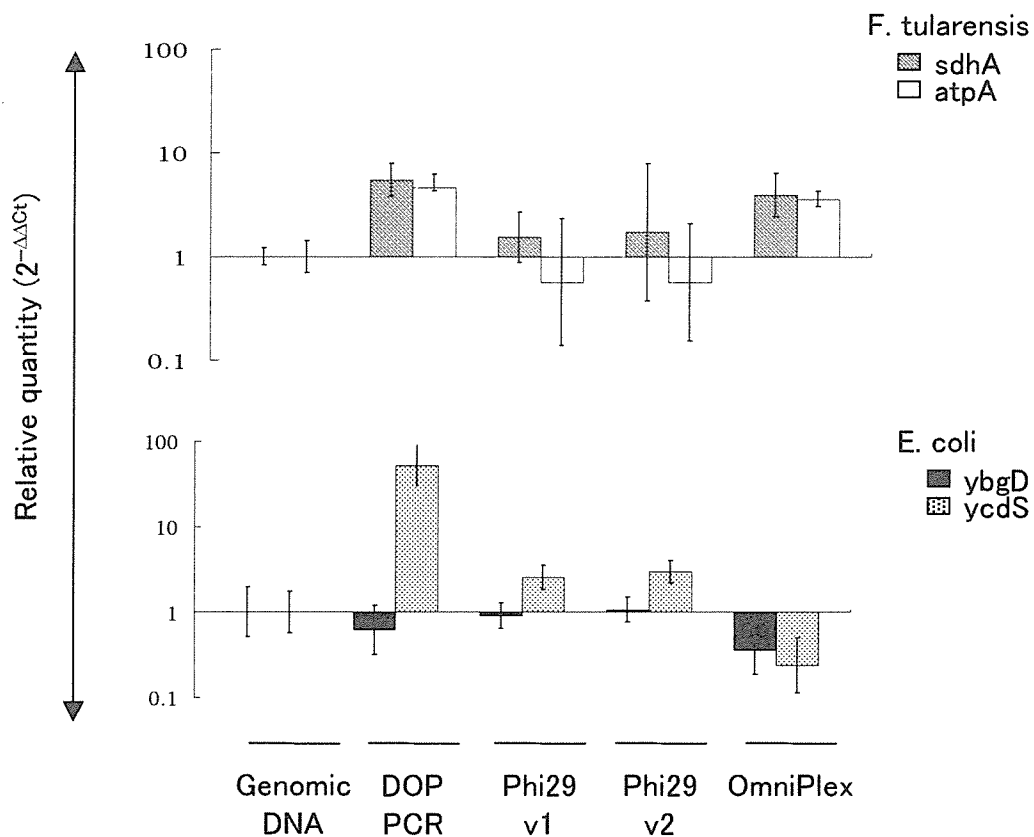


図4 4種類のWGA法における増幅時における偏りの測定。図に示した遺伝子は、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を用いて各バクテリアのgapA遺伝子にて標準化(normalization)を行い、gapA遺伝子の相対比として示した。このリアルタイムPCRには、20ngのゲノムDNA又は100倍希釈した各WGA法により増幅した反応溶液を2 μ l使用した。試験は3連で行い、各遺伝子のgapA遺伝子に対する増幅相対平均値及び最大最小値を示した。縦軸の値は1に近いほど増幅時の偏りは少ない。

表2 マイクロアレイのために設計したオリゴDNA

Sym	Gene	Accession	position	Sequence (60 mer)*	Tm
bol	name	number			
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> Schu 4, complete genome (NC_006570)					
F01	atpA	FTT0062	898	AGAGTGCAAGAGTCAACGAAGAATATGTCGAGAAATTTACAAATGGTGAAGTGAAGGT	73.7
F02	sdhA	FTT0074	498	TTCTATACGGAGTGGTTTGCTGTTGATTGGTTAAGGCGGATGATGGTAGTATGCTGG	75.3
F03	valA	FTT0109	32	AGTCTCAGGGATCTAGTAATCTAAGTGGAGAAATGACAAACCATCAGAAAAGTAGGCAC	73.4
F04	valB	FTT0110	280	TTTGAAGTAACAAGTGTACTCTAGCAACTCAATGTGGCGATGAGCCGCGATGTTATT	75.3
F05	parC	FTT0396	791	AGGTTTCAAGTGTGCGGTAATGGAGCAAAATCGCTAATGAACTTAAGCAACAGAAGATTA	74.8
F06	asd	FTT0425c	757	AGGGTCTAGAAGTAGAGTACTATCTTTGCTAAGCGTAGTGTGATGACAGCGTCTATCCA	75.0
F07	aroA	FTT0588	448	CCTTTGACAATAATAGCTAAATCTTTGGATGGTGGTTATATAGAAGTTGATGGCGAGAAG	71.3
F08	mdh	FTT0535c	289	AGCAACAATTCGCCACCACCCTTCTAGTTCGATACTATAGCATCTAAACGCTCTTG	75.0
F09	alr	FTT0573	893	CTATGGCTGGTAGAATGAGTATGGATGGTCTGACAGTATCGTTAGGAATTAATGAATACG	72.1
F10	fopA	FTT0583	262	GGAACTCCTAACTCTCCATCAGGTGCTGGTGCTAACTTCAACAATCGTTATAACATCAAT	74.9
F11	galE	FTT0791	601	CTCATGCCTTATGTCGCGCAAGTAGGTGCTGGTAAACTAGCTAAACTTAGTATCTTTGGT	75.0
F12	mglB	FTT1276	302	GCGAATTGGTTATGGAATTAATATCAATGAAGCGAAGATGATAAACTGCTAATCCTA	71.6
F13	iglD	FTT1356c	1014	TTATAAGGATAAGACCTGTCTGCAAACCTTCAACATCTAAATCAAAGCTAACGATTCCCT	71.8
F14	iglC	FTT1357c	561	CAGTAGGATCAGTCTCACATGAATGGTCTCGCCACTTGTACCTGTTGTTCTTGTATCA	74.8
F15	pdpD	FTT1360c	53	CCTCTAGCTGGTACAGTTGCTAAGACACTAAAACCTTGTGAACCTCTAATCTCTCATGT	73.0
F16	minD	FTT1606	32	TAGTAACTTCTGGTAAAGGTGGTGTGGTAAAACTACTTCAAGTCCCGCTGTTCATATG	74.6
<i>Escherichia coli</i> K12, complete genome (NC_000913)					
E01	ykgK	b0294	26	GAGTACAGCTTGGCCCTCAGCATTACGCCGATGGGTATACACTGTCTTACACTACAATTT	76.6
E02	eaeH	b0297	399	TTCGCTGGAAATGCTTTATCCGATTTATGATACGCCGACAAATATGTTGTTCACTCAGGG	74.8
E03	ykgA	b0300	581	CGTCTGCTGTAGCCAGATTTCTGTGCGATATCTTCGATTGAAATAGGGTGTCAAGATTG	75.4
E04	betT	b0314	819	GTTCTGATTTGTTATGGGCGACACTTCGTTCTGCTTAAATGCAGTGTGCTGAATGTGG	77.0
E05	yahE	b0319	223	GGTATTACGGTTGTCAACATCTTCATATAGAGATGAGTGTGTCGGCGTTGGCTGTCC	76.6
E06	yahK	b0325	1	ATGAAGATCAAAGCTGTGGTGCATATTCGCTAAACAACCCTTGAACCGATGGATATC	74.9
E07	ybbV	b0510	1177	GGTAAGTTTATCTACTTATGGAACCGTTATCGCGTGTTCATGGTTTGTGCGGCTCATC	75.3
E08	ybbY	b0513	1030	AGTATCCCTTACCCTGAGTAGTGCAGTGCATGCTGGTTTCTTATCTGCCTTACTCTTT	76.1
E09	yIbA	b0515	18	GGTTACAATCTTTCGAGTAAATATAGCTGAACGCTTACCACGCCCTACACATAACCAG	75.2
E10	ybcK	b0544	401	CCATACTTATAGCACAAAGGGCAAATGAAGAAAGCGAGATAAAGTCAAGTCGGGTTAAAT	73.1
E11	ompT	b0565	425	CTGAATCCCTCCTCAGAACTGTAGATATAGGAACCACTCTGGCTGTAAAGCTATAACGG	74.9
E12	ybgD	b0719	350	GCCACTTATTTGCTATGATGCTCCCGTTTATATGGGTTGCTGACTTGTCCAAGATCT	76.0
E13	yedQ	b1022	237	TATGTGTGCGAGCATATGTGCAATCAATATTTAACGGTACACCGCAAGTTGGACTG	75.6
E14	yedR	b1023	1168	CAATTGCGACGCATTTGCCAAACCTGATTCAAGGGTGAAGAATGTCATAACCGAGTTT	76.4
E15	yedS	b1024	983	GTTAATGCTGTCCAGGCTGTTCACCTCCAGATTAATAATTACGTGGCTCGACTCTCT	75.1
E16	yciQ	b1268	704	CGAATATTTTCAGCCATCTCTTTTACCCTCCACGTCATCGTGTAAATTTGGTTCCGT	74.3
Position marker/ <i>Homo sapiens</i> aryl hydrocarbon receptor (NM_001621)					
P	AHR	NM_001621	701	AGAGACCGACTTAATACAGAGTTGGACCGT	62.0

全てのオリゴDNAは、スライドへ共有結合させるため5'アミノ基を付加した。

* AHRは、ポジションコントロールに用いた。

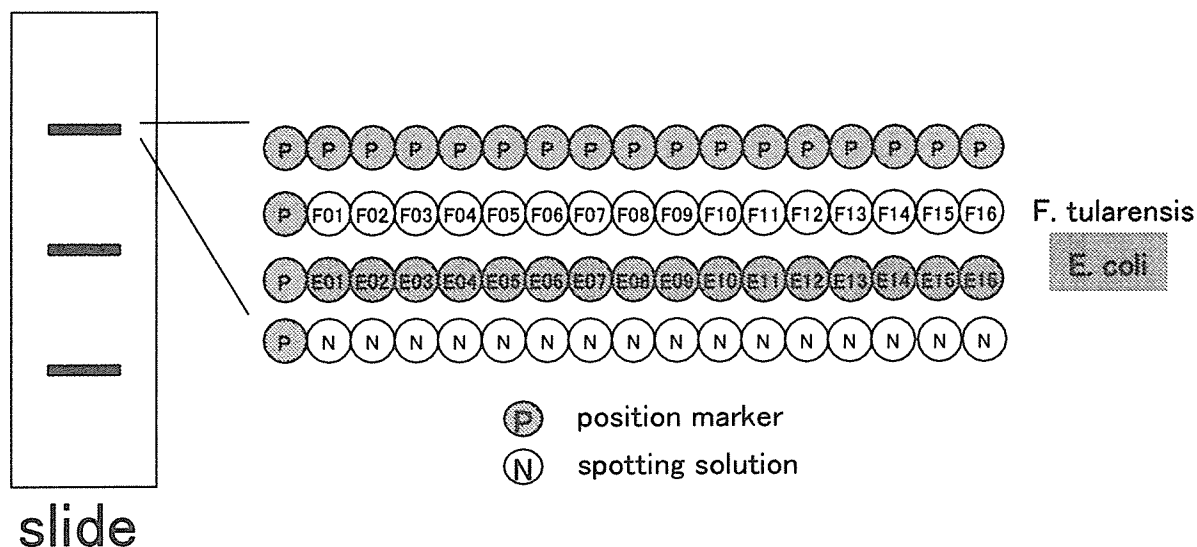
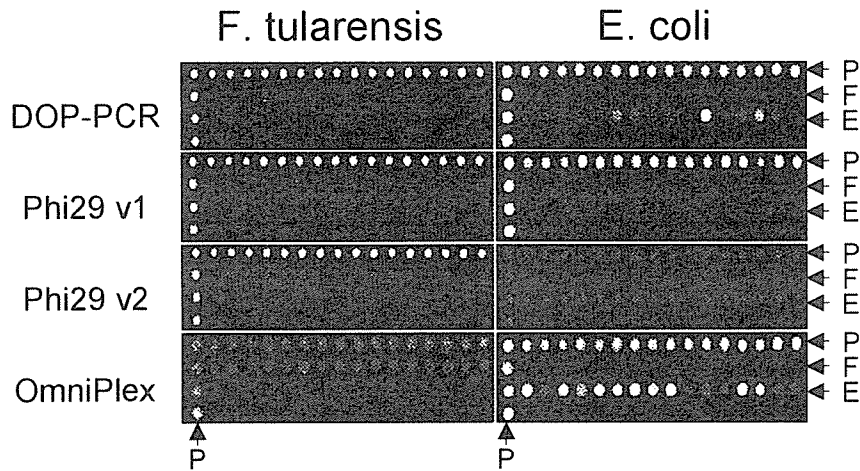
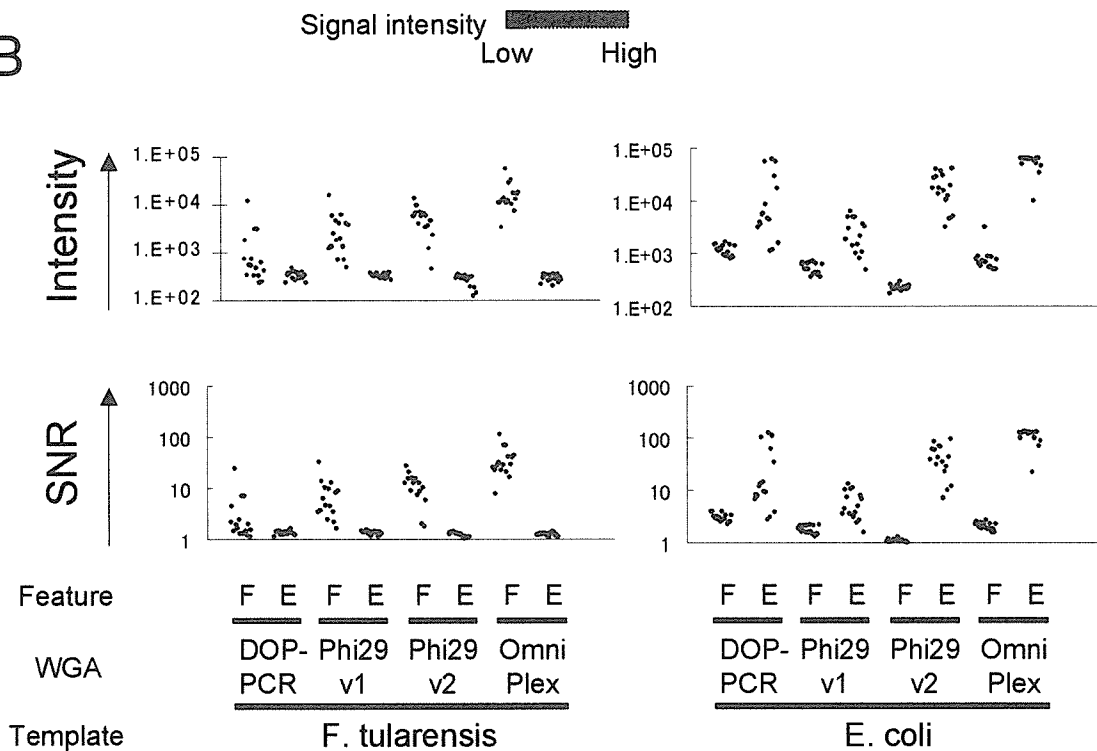


図5 マイクロアレイのレイアウト。オリゴDNAプローブは、左図に示した1 inch × 3 inchスライドに3アレイ分ポットした。Cy3ラベルAHR及びCy5ラベルAHRを等量混合しポジションコントロール(灰色スポット)とし、スポット溶液のみをネガティブコントロール(白スポット)としてスポットした。F. tularensis(黄色)及びE.coli(オレンジ)の遺伝子を標的としたオリゴDNAは、各バクテリアにつき16プローブをスポットした。全てのスポットの直径は180 μ m、中心間距離300 μ mでスポットした。スポットレイアウト中に書かれている記号は、表2に示した標的遺伝子を表している。

A



B



F; features of *F. tularensis*
E; features of *E. coli*.

図6 マクロアレイを用いた病原体検出。 *F. tularensis*及び *E. coli*から抽出した10 ngのゲノムDNAを鋳型として用いて、各WGA法を用いて増幅し、ULYSIS Alexa Fluor 660 Nucleic Acid Labeling Kitでラベル化後、1.8 μ gのラベル化サンプルをマイクロアレイにハイブリさせた。ハイブリさせたマイクロアレイスライドは、洗浄・乾燥後、ScanArray Express (PerkinElmer)を用いてスキャンした。(A)スキャン画像。ポジションマーカをP、 *F. tularensis*のスポットをF、 *E. coli*のスポットをEと示した。(B)スポットの蛍光強度の解析。スキャン画像をScanArray Express softwareで解析し、各スポットのシグナル、ローカルバックグラウンド、シグナル-バックグラウンド(Intensity)、シグナル/バックグラウンド(SNR)をエクセルに出力した。各遺伝子の平均シグナル強度及(上段; Intensity)及びシグナルノイズ比(下段; SNR)は点で示した。

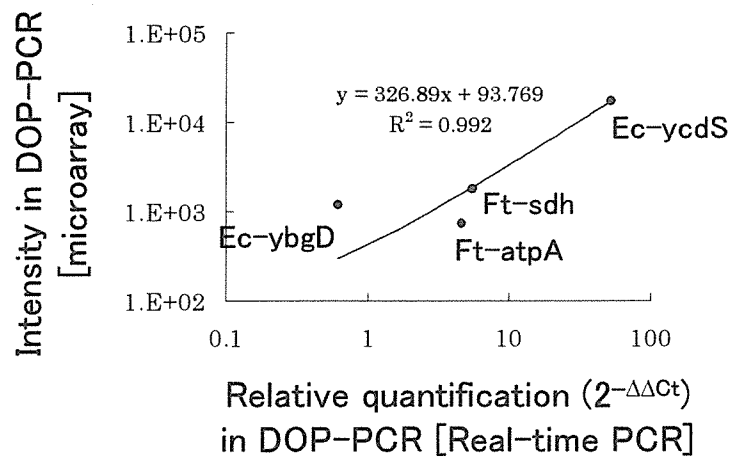


図7 マイクロアレイで検出される蛍光強度(Intensity)とDOP-PCRにおける増幅の偏りとの相関。横軸に図6に示したマイクロアレイで測定された蛍光強度(シグナルバックグラウンド)を、縦軸に図4で示した各遺伝子の2^{-ΔΔCt}値を示した。

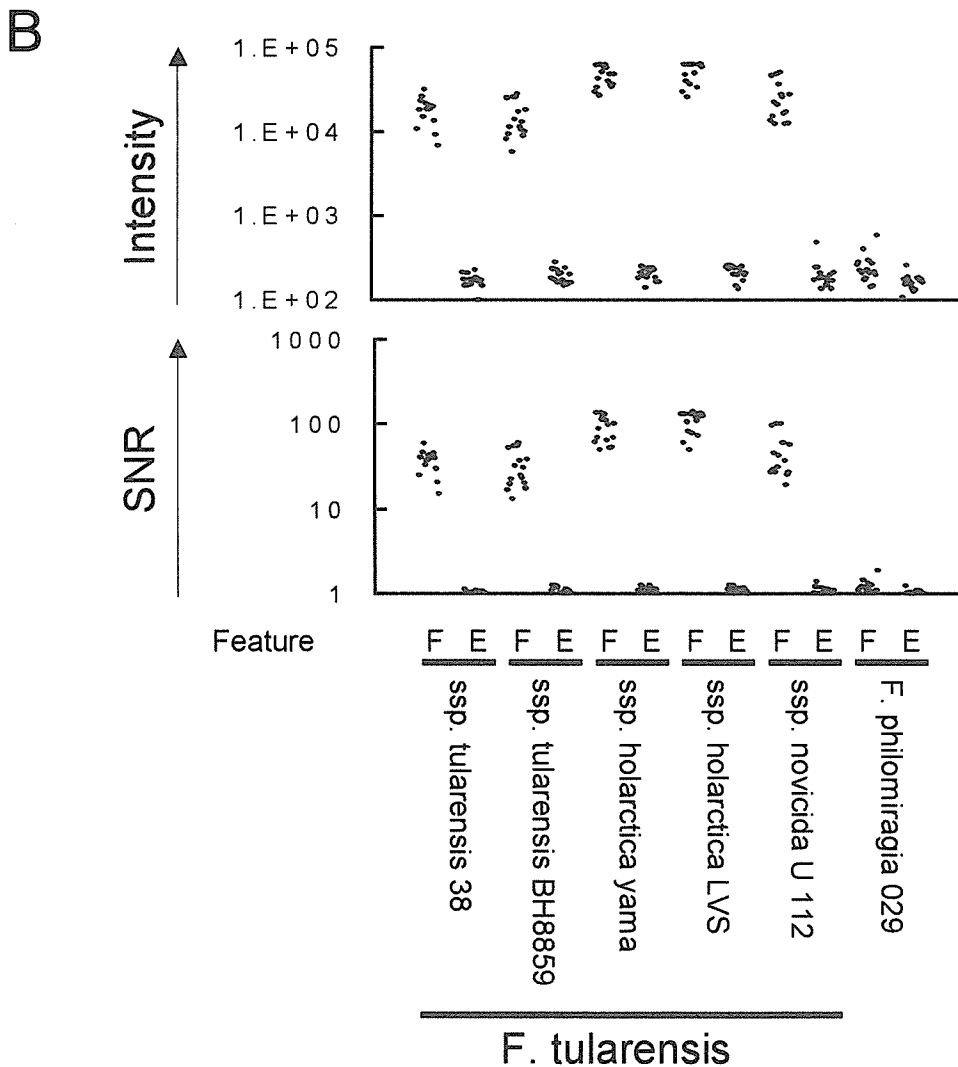
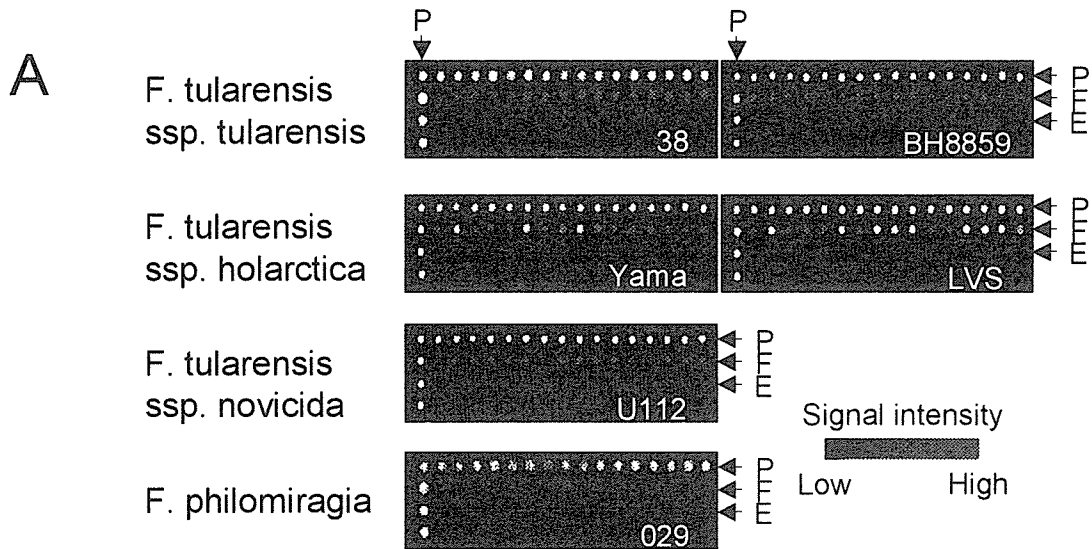


図8 F. tularensis株の検出。F. tularensis株のゲノムDNAを鋳型とし、OmniPlex WGAにて増幅・ラベル化後、サンプルをマイクロアレイにハイブリさせた。(A) F. tularensis株由来のサンプルから得られたスキャン画像。(B)得られたスキャン画像を解析し、スポットの蛍光強度の解析。スキャン画像をScanArray Express softwareで解析し、各スポットのシグナル、ローカルバックグラウンド、シグナルバックグラウンド(Intensity)、シグナル/バックグラウンド(SNR)をエクセルに出力した。各遺伝子の平均シグナル強度及(上段)びシグナルノイズ比(下段)は点で示した。

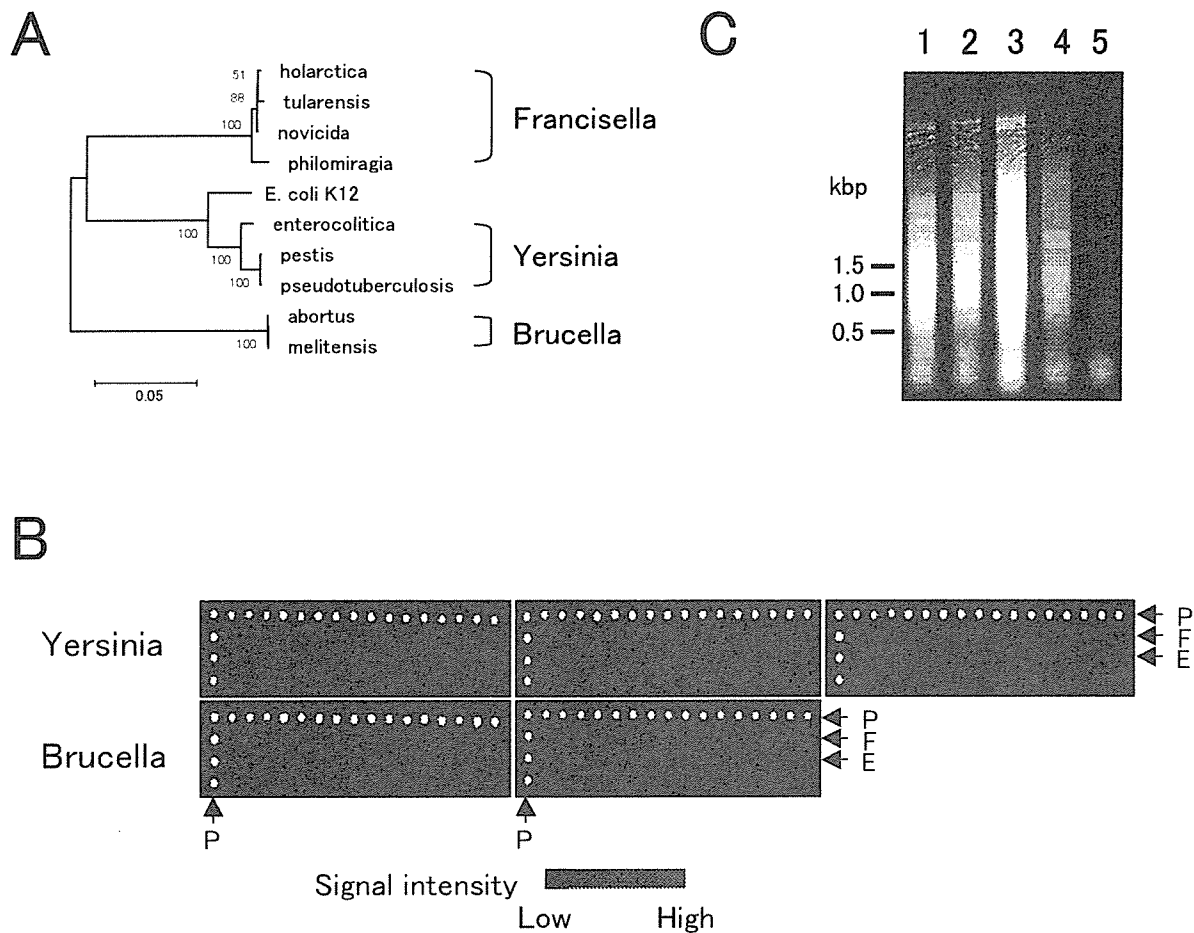
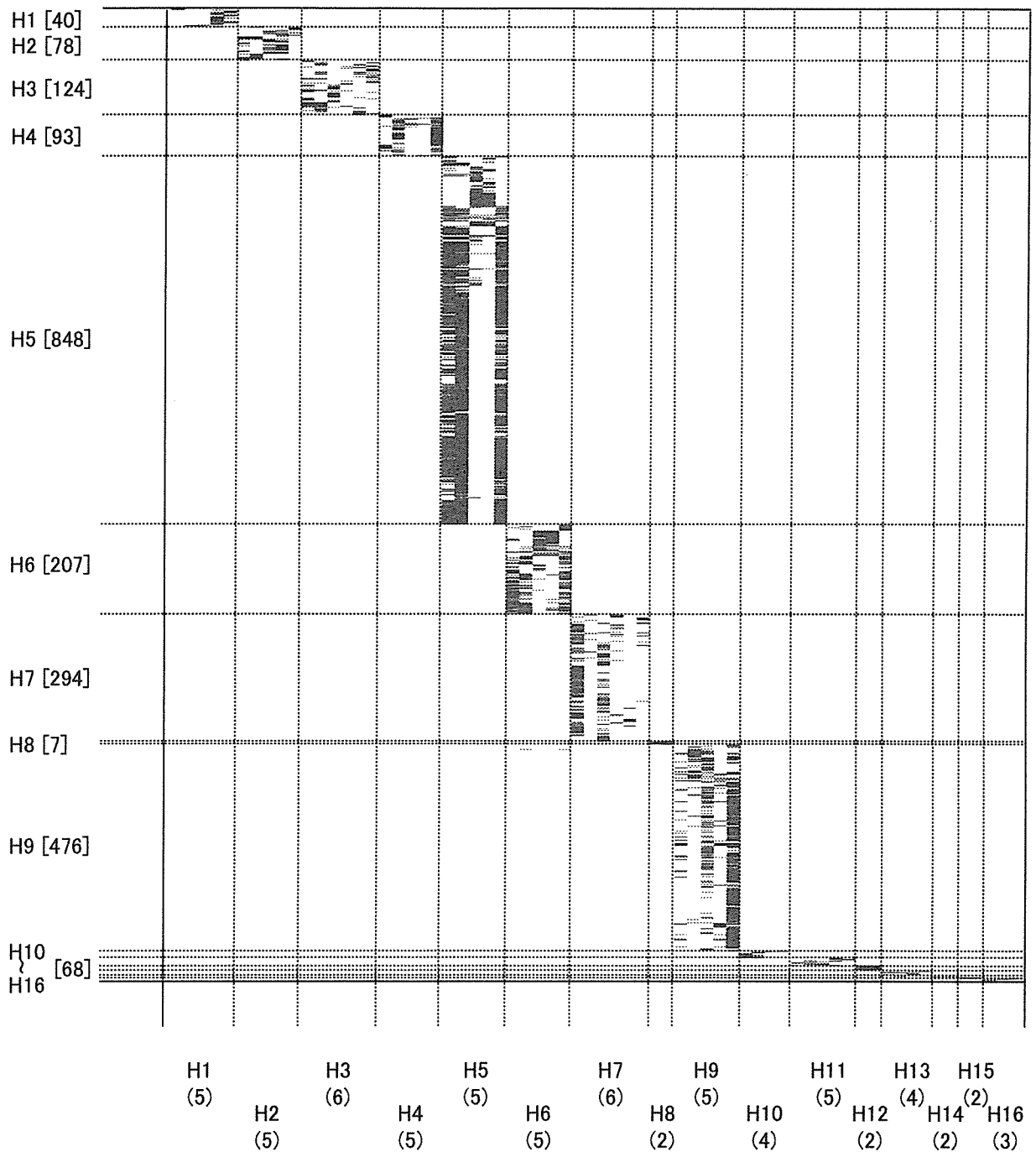


図9 マイクロアレイのクロスハイブリの検討。(A) *F.tularensis*及びその他バクテリアの16Sリボゾーム遺伝子における系統樹。系統樹解析には、*F. tularensis* subsp. *tularensis* (NC_006570), *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (AJ698866), *F. novicida* (AY968237), *F. philomiragia* (AY928394), *Brucella melitensis* biovar *Abortus* (AF091354), *Brucella melitensis* (AE009462), *Yersinia pestis* (AF282306), *Yersinia enterocolitica* (Z49828), *Yersinia pseudotuberculosis* (AF366375), *E. coli* K12 (U00096)を用いた。(B) マイクロアレイスライドのスクリーン画像。(C) *Yersinia enterocolitica* (lane 1), *pestis* (lane2), and *pseudotuberculosis* (lane 3), and *Brucella abortus* (lane 4) and *melitensis* (lane 5) から抽出したゲノムDNAを用いて OmniPlex WGA法で増幅した産物を電気泳動した。

表3 鳥インフルエンザウイルスのHAに対するマイクロアレイプローブ

Probe name	Probe Sequence	Length	Tm	GC%
H1-AB271115-276	GCTGCTCACGGCGAACTCATGGTCCCTATATAATAGAGACTTCAAATTCAGAAAATGGAAC	60	73.8	41.7
H1-AY180460-1582	ATGGAGTGAAATTTGGAATCAATGGGAGTCTATCAGATTCTGGCGATCTACTCAACTGTCCG	60	74.7	43.3
H1-AY233393-906	TATAAACACCAGCCTTCCATTTTCAGAAATATACACCCAGTCAAAATTTGGAGAATGTCCAAA	60	73.5	38.3
H1-CY004546-49	TTGTGCTATTCTGTATATTTCACTGTACTGAAAGCTGACACCATCTGTGTGGGCTACCATG	60	74.9	43.3
H1-Z46441-914	CCTTGAACAGTAGTCTTCCCTTTTCAGAAGCTACATCCCATCACTATTGGAGAATGCCCCA	60	75.6	45
H2-AB266382-1	GAACATGGTCTGGTTGACAAAAGAAAGGGTGAATACCCAGTGGCCAAAAGATCATACAA	60	74.9	41.7
H2-AY180400-30	GCCAGAATGGTCATATATAATGGAGAAAAGAAAATCCGAGGAATGGTTTGTGCTACCCAGG	60	74.5	43.3
H2-CY003863-1548	TGAAGAAGAATCCAAGCTGAACAGAACCGAAATGAAATGAAATGGAAATTTGAGCAACATGGG	60	75.1	41.7
H2-CY003992-72	CACAGTAGTAAAAGGGGACAAAATATGTATCGGATACCATGCCAACAAATCCACAGAAAA	60	74.5	41.7
H2-CY005546-963	TGTCCATCCACTGACAATAGGTGAATGCCCTAAATATGTGAAATCAGAAAAGCTGGTCTT	60	74.3	40
H3-AJ697866-230	GTTTCATCACTGAAAGTTTCACTTTGGACAGGAGTAACTCAGAATGGAGGGAGCAATGCTTG	60	76.2	46.7
H3-AJ697866-447	AACAACCTGTATGTTCAAGCCTCAGGAAGAGTACAGACTCTACCAGGAGAAGCAACAG	60	76.9	48.3
H3-AY180431-341	CTCAGGCATTTGGAGTTCATTACTGAAGTTTACCTGGACAGGGGCTACTCAGAATG	60	76.9	48.3
H3-AY633172-1052	TAGCAGGGTTCATAGAAAATGGATGGGAAGGAATGATAGATGGTTGGTATGGTTTCAGGC	60	75	43.3
H3-AY779254-323	CAGCTTACAGCAACTGTTACCCCTTATGATGTGCCGGATTATGCCTCCCTTAGGTCACTAG	60	76.4	48.3
H3-CY005941-548	TGGAAGTGCTTACCAGTGTGAATGTGCAATCAAAGGAATGAAATGAAATTTGCAAAAT	60	73.5	36.7
H4-AY180443-86	CGATGTGCCAGACTACCAGAGCCTGAGAAGCATACTCGCCAACAAATGGGAAATTTGAATT	60	77.1	46.7
H4-CY004939-1615	TTCTTTTCCATATCATGCTTCTTACTCGTTGCACTACTTTTAGCCTTTATTTTGTGGGC	60	73.4	38.3
H4-CY006030-358	CGTGCCAGATTACCAGAGTTTGGAGAAGCATACTGGCCAACAATGGGAAATTTGAGTTCAT	60	75.1	41.7
H4-DQ327834-1552	AACCGATTTTCAGATTCCAGGAGTCAAGTGTGATGAACTCCAGGATACAGGACATTTCTTTGG	60	74.8	43.3
H4-J02102-140	TTGACTGATGACCAAGTAGAAGTTGCTACTGCCAGGAATAGTGGAAATCGCAACATCTA	60	75.5	43.3
H5-AB241624-63	TGGTTACCATGCAAAACAACCGACAGAACAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAATGTTAC	60	73.6	38.3
H5-AM231714-117	CTATAGCAGGTTTTATAGAGGGAGGATGGCAGGGAATGGTAGATGGTTGGTATGGGTACC	60	75.8	48.3
H5-AY497079-178	TGGCTTCTTGGAAAATCCAATGTGTGATGAATCTCTGAATGTGCCGGAATGGTATACAT	60	75.7	41.7
H5-AY497079-20	ATCATGCAAAACAATTCACAAAACAAGTTGACACAATCATGGAAAAGAATGTGACGGTCA	60	73.4	35
H5-AY590576-270	TGTATGGAAAAGTGAAGAAAACGGAAACGATGACTACCCGCAGTATTCAGAAAGAAACAAGA	60	74.6	41.7
H6-AF474034-718	TAAAACCAGGGGAAACCTTGAATGTGGAATCCAATGGAAATCTAATCGCTCCTTGGTATG	60	74.6	41.7
H6-AY421063-1579	GGTGTGATGCAAAATCTTGCCTTTATAGTACGGTATCGAGCAGCCTAGTGTGGTAGGG	60	74.9	45
H6-CY004137-977	TCCCAAAATATGTTAAAAGTAAGAGCCTAAAACAGCAACTGGTCTGAGGAATGTCCACA	60	74	40
H6-CY004142-1666	TGGGTCTTTGGATGTGCTCGAATGGCTCAATGCAATGCAGGATATGTATATAATTAGGAA	60	74.3	40
H6-DQ376652-1658	GATCATGGCAATGGGTCTTTGGATGTGTTCAAATGGTTCATGCAATGCAGGATATGTAT	60	74.6	40
H7-AB269694-212	ATGCCAATTTGGAAGGGGATTGCTATGATGAACTGAGTGGGCAACAATAAAGTAAATTTGCCCT	60	74.3	40
H7-AF202231-1433	CTGAAGAGGATGGCCTGGTTGTTTTGAGATTTCCACAAATGTGATGATGGCTGTATGG	60	75.3	43.3
H7-AF322024-138	GCACAAGATCAGGTTCTTCTTTCTATGCAGAGATGAAGTGGTTGCTGTGCAATTCAGACA	60	75.3	43.3
H7-M24457-1564	ATTGACCCAGTCAAATTTGAGTAGTGGCTACAAGATGTGATACTTTGGTTTAGCTTCGGG	60	74.5	41.7
H7-AY303633-1532	CAATACAGAGCCGAATCCGCTATGATGAACTGAAATCAGATCAGACCCAGTCAAATTTGAGTGGC	60	75.1	45
H7-J02164-111	CGGAACAAGTGAACACACTAACAGAGAGAGGGATTGAGGTAGTGAATGCCACAGAAAC	60	75.3	45
H8-J02089-167	GTGGAACAGAGAAACATCCCGCTTATTGTAACACTGATTTAGGTGCCCCATTGGAACCTG	60	75.8	45
H8-J02089-89	TACCAATCAAACAACCTCCACAGACACAGTGAACACTCTCACAGAACAAGATGTGCCAGTC	60	76	45
H9-AF218089-161	GACATTTGCGATGAGATCCAATGGAAATCTAATTTGCTCCGTTGGTATGGACACATCTCTC	60	75.3	45
H9-AF218095-18	AGGCTGACACAACAACAAGTGTGACAACAGAAGATATAAACCCGAACCTTCAAACCAAGTGA	60	74.7	40
H9-AM286688-359	TTCTTACCAAAAGAATCCAGATCTTTCCAGACACAATTTGGAATGTGACTTACAGTGGAAAC	60	73.6	40
H9-AY768559-194	GGAACTGTCCCAATATGTTGGAGTGAAGAGTCTCAAATGGCAGTTGGTCTAAGGAATG	60	75.3	45
H9-DQ108932-165	AACTGAGTAAGATCCAATGGAAATCTAATTTGCTCCATGGTATGGGCACATCTTTCCAGG	60	75.4	43.3
H10-CY005930-115	CGTAAAGACTCTCACAACGAAAAGGAAGAGGTGACCAATGCTACTGAAACGGTGGAAAAG	60	75.5	45
H10-CY005930-1389	ATCTATACGAAAAGGGTGAAGGAAGCAACTAAGGCCAAATGCAGAAAGAGATGGAAAAGGGT	60	75.1	41.7
H10-J02110-261	CAGCTTGTGACCTGCACCTTACCAGGAGATGGGAGACTTTGATAGAGAGAGAAAATTTCTA	60	75.9	46.7
H10-M21647-1168	AGCTATTGACCAAAATCACAGGGAAACTGAACAGGTTGATTGAGAAGACCAACACTGAGTT	60	75.2	41.7
H11-AY684895-767	TTGGACAATGGTCAAACAGGAGAGTCAATAACATTTGAGTCTAATGGTGCATTTCTTGGC	60	74.9	41.7
H11-CY005923-79	CAGACGAAATCTGCATTGGATACCTGAGCAACAACCAACAGAGAAAAGTGGACACAATAA	60	74.7	41.7
H11-CY005924-538	AGTCAGGGACATATCCTGTTATACGGAGTAGCTTCAACAACCAACCAAGGAAGAGATGTAT	60	75	43.3
H11-J02107-75	AAAGCAGATGAGATCTGTATCCGGTATTTAAGCAACAACCTGACAGACAAAAGTTGACACA	60	74.3	40
H11-J02161-65	CCTTTGCGTGAAGCGGATGAGATCTGTATTGGCTATTTAAGCAACAATTCGACAGACAA	60	75	41.7
H12-CY012840-392	AAGAGTGAAGATGTTTGTATTCACCAATGGAAATGTCACATACACTGGAACCGCAAGGC	60	75.1	41.7
H12-J02104-258	GCAATCCCAAATGTGATCTTTATTTGAAATGGCAGGGAATGGTCATACATAGTAGAGAGGC	60	73.9	41.7
H13-AY684887-1281	TCAGGTGGAACAAAGAATAAATATGCTTGCAGACAGAAATAGATGACGCTGTAAGTATGT	60	72.7	36.7
H13-CY005931-1281	TCAGGTGGAACAAAGGATAAATATGCTTGCAGACAGAAATAGATGACGCTGTAAGTATGT	60	74.1	40
H13-K00383-268	GGGTGGATAGTAGGAAATCCTGCCTGTACTAGCAACTTTGGAATCAGAGAGTGGTCATA	60	75.1	45
H13-M26090-1531	ATGGAACGTATGACCACACTGAGTATGCAGAGGAGTCAAAGTTAAAGAGGCAAGAAAATCG	60	75	43.3
H14-M35996-1403	TAAAGAAAGTGCAGAAAGTAAAGGCAACCGTTGTTTCGAGATATTCATCAGTGTGACA	60	74.9	41.7
H14-M35996-857	GGATTGGGTCATGCACAAGCCCTTGCTTAACTGATAAAGGTTGGATCCAAAGTGACAAAC	60	76.1	45
H15-L43916-1422	CTATGAGAGAGTGAAGAGACGTAAGGGAGAATGCCGAGGAGGATGGAATCGGATGGTTT	60	76.5	48.3
H15-L43916-569	AACCGCCCTAATGTTGGGGAGTACATCATTCAAGTCCCTTGGATGAGCAAAAATAGC	60	75	41.7
H16-AY684888-687	AAAGAGTGGAGCAGACGGTACGAATTAAGAAATGGAACCCAGGATAGGAGACGGTCAAAGA	60	76	45
H16-AY684891-181	GATCTCGTTGAAAACAACACACAGGAACATACTGCTCACTGAATGGAATCAGCCCAATT	60	75.7	43.3
H16-CY005933-695	GAATGGAGCAACCGGTATGAACTTGAATTTGGAACCCAGAATAGGAGATGGACAGAGAAGC	60	74.7	43.3

鳥インフルエンザHA型 [登録株数]



各HA型を標的としたマイクロアレイプローブ (設計数)

図10 鳥インフルエンザHAタンパク質を標的としたマイクロアレイプローブの事前評価。鳥インフルエンザのHAタンパク質を標的とし設計した66種類のマイクロアレイプローブを各々BLASTサーチし、The Influenza Sequence Databaseに登録されているインフルエンザ株 (HA1~HA16型; 合計2233株) とのE-valueを総当りで示した。この解析には、ProbeMower (Symplus, 東京) を使用した。縦軸にはデータベースに登録されているインフルエンザHAタンパク質の型及び登録数を、横軸には本研究で標的とした各HA型及びプローブ数を示した。BLASTサーチにおいて、E-valueが $1E-15$ 以下 (約95%ホモロジー以上) を示したのをマイクロアレイにて検出可能と推測し、赤色バーで表した。

表4 鳥インフルエンザウイルスのHAに対するマイクロアレイプローブの評価

HA型	プローブ数	データベース登録株数*	検出可能株数**	検出不可能株数
H1	5	40	38 (95%)	2 (5%)
H2	5	78	78 (100%)	0 (0%)
H3	6	124	116 (94%)	8 (6%)
H4	5	93	88 (95%)	5 (5%)
H5	5	848	823 (97%)	25 (3%)
H6	5	207	199 (96%)	8 (4%)
H7	6	294	275 (94%)	19 (6%)
H8	2	7	7 (100%)	0 (0%)
H9	5	476	450 (95%)	26 (5%)
H10	4	16	15 (94%)	1 (6%)
H11	5	17	17 (100%)	0 (0%)
H12	2	12	11 (92%)	1 (8%)
H13	4	12	10 (83%)	2 (17%)
H14	2	2	2 (100%)	0 (0%)
H15	2	2	2 (100%)	0 (0%)
H16	3	5	5 (100%)	0 (0%)
合計	66	2233	2136 (96%)	97 (4%)

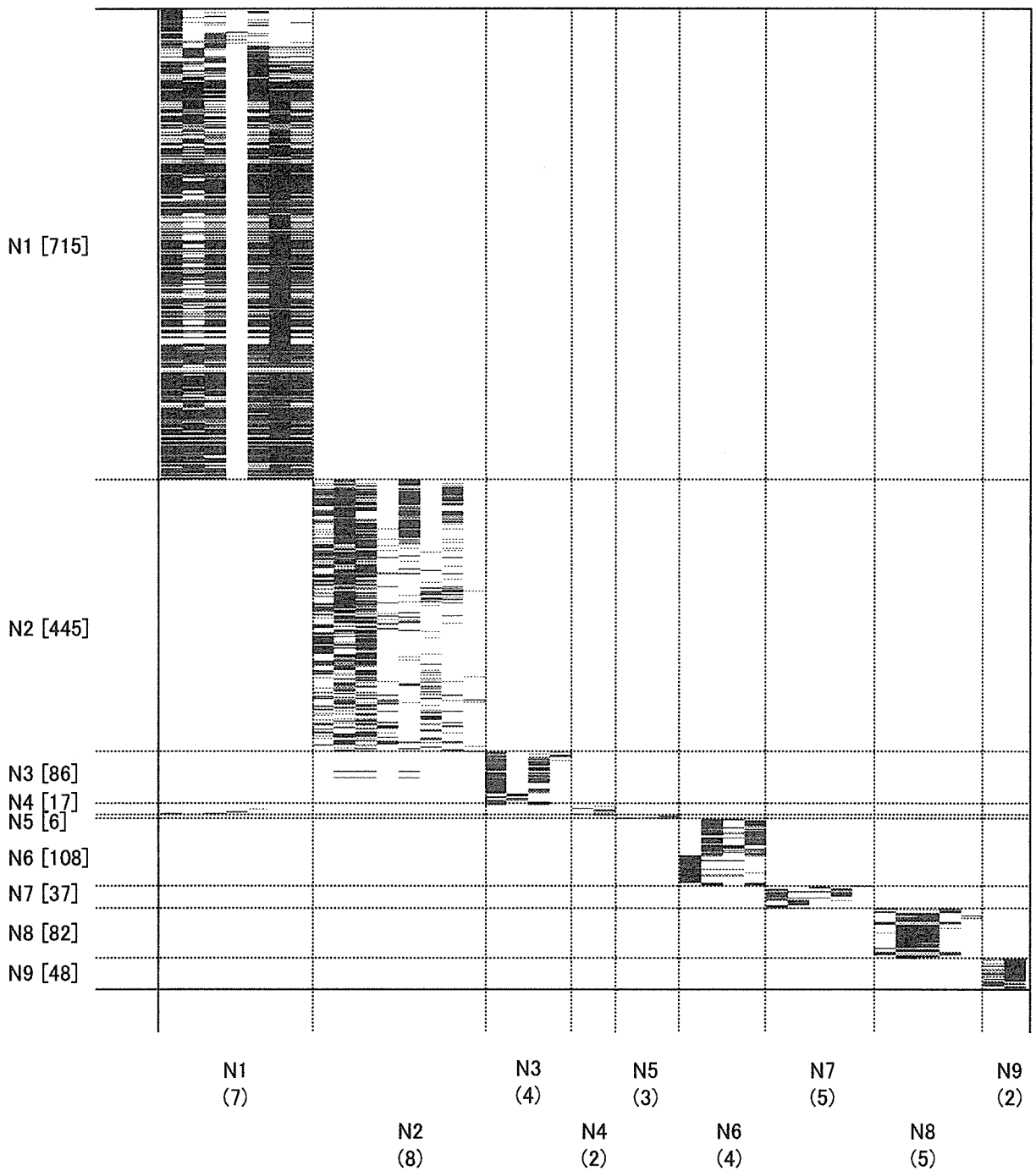
* The Influenza Sequence Database <http://www.flu.lanl.gov/> (2006年10月時点)

** 各型を標的とした複数のマイクロアレイプローブ内のBLAST検索でE-Valueが $1E-15$ 以下 (ホモロジー約95%以上)を示した株数。

表5 鳥インフルエンザウイルスのNAに対するマイクロアレイプローブ

Probe name	Probe Sequence	Length	Tm	GC%
N1-AB265202-1111	TGAAGCAAGATATCGTAGCAATAAAGTGGTTCAGGATATAGCGGGAGTTTTGTCCAGC	60	75	43.3
N1-AF250481-570	TGGCATAATAACAGACACCATCAAGAGTTGGAGGAACAACATACTGAGGACACAAGAGTC	60	74.8	43.3
N1-AY261521-1200	TTGTAGCAATAAAGTGGTTCAGGATATAGCGGAAGTTTTGTTCAGCATCCAGAAGTGA	60	74.2	40
N1-CY015137-1165	AGACTGATGGTAGCTTCTCTGTGAAACAGGATATTGTAGCGATTACTGATTGGTCAGGCT	60	75.1	43.3
N1-DQ376724-1297	CTAGTGGGAGCAGCATATCCTTTTGTGGTGAAATAGTGACTGTGGGTTGGTCTTGGC	60	77	48.3
N1-DQ997095-612	AGTTGGAGGAACAACATACTGAGAAGTCAAGAGTCTGAATGTGCATGTGAAATGGCTCT	60	74.9	41.7
N1-ISDN48794-1199	CAGGATATAGCGGGAGTTTTGTCCAGCATCCAGAAGTGCAGGATTAGATTGCATAAGAC	60	75	45
N2-AY180820-211	GAATACAGGAATTTGGTCAAAACCACAATGTCAAATCACAGGGTTCCGCTCCTTTCTCCAAG	60	75.2	43.3
N2-AY254113-515	CATGTTGCAATGTTTGTGTCAGTGGGATAGAAATGCGACTGCTAGTTTCATTTACA	60	75	41.7
N2-AY664708-914	TAAATATGGCAGATTATAGTATTGATTCCAGTTATGTGTGCTCAGGACTTGTGGTGACA	60	72.3	36.7
N2-AY768566-77	GAAATGATGTTTGGATGGGGAGAACAATCAGCAAGGATTCACGCTCAGTTATGAAACTT	60	75	41.7
N2-CY005626-1312	ACAGGAACTAGAGTATGGTGGACCTCAAATAGTATTGTTGATTTTTGTGGCACTTCAGG	60	73.4	40
N2-DQ116085-450	AAATAGGCAAGTGCATAGTGCACAAGGGAACCCTACATTAAGCTGCTAGTAAACGATCAGT	60	71.2	35
N2-DQ402042-401	TTGGGCAGGGAACCACGCTAGACAACAACACTCAAATGGCACAATACATGATAGGATTC	60	76.4	45
N2-DQ470000-125	GCAACTCCTCCCAAACAACCAAGTAATGCTGTGTAACCAACAATAATAGAAAGAAACA	60	74.4	40
N3-AJ627494-1258	TC TTGGACAAGCAATAGTATAGTTACTTTCTGTGGACTAGACAATGAACCTGGATCGGGA	60	74.1	41.7
N3-AY303638-327	TGAGAACAAGGATGCATAGTGCACAAGGGAACCCTACATTAAGCTGCTAGTAAACGATCAGT	60	75.4	45
N3-AY646080-68	TGTCAACAATAGCCCTTCTCATTGGAGTGGGAAACTTAGTTTTCAACACAGTCATACATG	60	73.8	40
N3-K01014-48	AGGTGTGCTGAACACTACTCTATCAACAATAGCCCTTCTCATTGGAATTGGAACCTGAT	60	74.7	41.7
N4-AB274042-632	GTATCATCACCGACACATTAAGAGCTGGAAGGCAACATTATGCGAACACAAGAGTCTG	60	74.9	43.3
N4-CY003986-1136	TTGAGATGGTATGGGATGCTAATGGATGGGTGTCAACAGACAAGGATTCAAATGGTGTAC	60	75.2	43.3
N5-CY005693-90	CCTTCATGTGGCGTCAATAGCCCTGGGAGTAATATCAGCAACCAAGACAACAAGTACAT	60	74.8	41.7
N5-K01018-103	CAATAGCCATAGGAACAATATCAGTGACAAAAGAAAGCAGCGTGATATCTGCAACACCA	60	75	41.7
N5-K01019-210	GTCAACAACACCATACATTCGAATCATGAGCCAGAAATTCCTCAACAACACGGAAACCTCTC	60	75.7	45
N6-AY180790-34	CCTGTGTGAAGTAAGCTCATGGCATATTCTGTGCAAGACAACGCAATAAGGATAGGTGA	60	75.1	43.3
N6-CY005569-24	TCCAAATCAGAAGATAATATGCATTCAGCCACAGGAATGACACTATCGGTAGTAAGCCT	60	73.8	40
N6-K01029-43	TGCATTTAGCTACAGGAATGACACTATCGGTAGTAAGCCTCCTAATAGGAATTGCCAAT	60	74.6	41.7
N6-V01095-29	ATCAGAAGATAATATGCATCTCAGCAACAGGAATGACACTATCCGTAGTAAGTCAGCTAA	60	72.6	38.3
N7-CY004435-1107	GCCGCACAATAAGTCCCTCGTTCCAGGAGTGGTTTTGAGATGTTGAAAGATACCTAATGCTG	60	76.3	46.7
N7-DQ374401-32	TCTGGAGTGGCAATAGCACTTAGTGTACTGAACCTATTGATAGGAATCTCAAATGTCGGA	60	73.5	40
N7-J02099-14	TGATTGAGAATGAATCCTAATCAGAAACTATTTGCACTATCTGGAGTCGCAATAGCACTT	60	72.5	36.7
N7-K01036-84	ACTTACTAATAGGAATATCCAATGTGGGGCTGAATGTCTCATTACACTTAAAGAACAACA	60	71.5	35
N7-M38330-608	GGGAATAATGACAATGCTACAGCGACGGTGTATTACAACAGGAGACTTACTACTACTATT	60	72.8	40
N8-DQ885994-795	TGGAGGACATATTGAAGAGTGTCTTGTACCCTAATGATGGGAAAGTGAATGCGTATG	60	74.9	43.3
N8-CY005045-667	CCTGGGCCGGAGATATTCTAAGAACTCAGGAATCATCATGCACTTGCAATTCAGGTGAAT	60	76	45
N8-CY005045-802	TAATTTGGCAAAC TGAATCAGCTTCAATGGAGGCCATATAGAAGAATGCTCATGCTACC	60	74.7	41.7
N8-CY005796-259	GCACCTTACATGAACAATACAGAAGCAATATGTGATGTCAAGGGCTTTGCACCTTTCTCCA	60	75	41.7
N8-K01002-170	TAGGGAAGACAATGAGACCGTGAAGATTGAAAAGGTAACACAATGGCACAATACCAATGT	60	75.1	41.7
N9-AY180832-255	TTCTATGCTCTAAGCCAAGGACAACAATCAGAGGGAACAACACTCAAACGGAACAATACAC	60	75.2	43.3
N9-U84107-237	CTTGGACAATGGGACTGGCCTGATGGGGCTAAAAATAGAGTACTTCTCTAAGATACAGAA	60	75	45

鳥インフルエンザNA [登録株数]



各NA型を標的としたマイクロアレイプローブ
(設計数)

図11 鳥インフルエンザNAタンパク質を標的としたマイクロアレイプローブの事前評価。鳥インフルエンザのNAタンパク質を標的とし設計した40種類のマイクロアレイプローブを各々BLASTサーチし、The Influenza Sequence Databaseに登録されているインフルエンザ株 (NA1~NA9型; 合計1544株) とのE-valueを総当りで示した。図10と同様の解析を行った。