

MPEX法の実用化への基礎研究

分担研究者

藤原 一彦 住友ベークライト株式会社 S-バイオ開発部 部長
木下 健司 武庫川女子大学 薬学部 教授
横山 兼久 住友ベークライト株式会社 S-バイオ開発部 部長研究員
藤本 健太郎 住友ベークライト株式会社 S-バイオ開発部 研究員

研究要旨

MPEX法による遺伝子検出における感度の向上と迅速化・簡便化を図るため、基板上でPCRとMPEX反応を行うPCR&MPEX法を検討した。前年度に行った本方法の基礎部分の検討により、基板上でPCRによる遺伝子増幅と基板上固相プライマーの伸長を同時に行うことが出来ることを確認した。本年度は、このPCR&MPEX法の実用化を図るため、本検出法に適したPCR反応装置並びに、基板の開発を行った。

基板上PCR専用のサーマルサイクラーの試作と専用の基板の開発並びに諸条件の検討により、約30分で、遺伝子の増幅から検出まで出来る条件を確立した。基板の量産化を念頭におき、射出成形による専用基板の成形検討を行い、PCRにおけるサーマルサイクルに適用し得る、反応部を肉薄化した基板の射出成形を検討し、蛍光スキャナーによるスポットシグナルの検出に適応した成形精度の基板を射出成形により得られる見通しを得た。

さらに、操作性並びに検査精度の向上を図るため、基板のデザインの検討を行い、基板本体とハイブリ用カバーが嵌合した構造の基板の開発に至った。この基板と、上記の基板用サーマルサイクラーの組み合わせにより、迅速、簡便、高感度を達成した、臨床検査の現場にも適用し得る、PCR&MPEX法の基礎技術の確立が出来た。

A. 研究目的

住友ベークライトは、酵素反応に適しており、かつ核酸や蛋白などの非特異的吸着の非常に少ない表面を有したアレイ用のプラスチック製基板を開発した。この基板は、基板上に固定化したプライマー伸長反応に適していると同時に、バックグラウンドが低く、プライマー伸長法による高感度な遺伝子検出が期待できる。本研究では、このプライマー伸長法により複数の遺伝子を同時に、高感度に検出する、MPEX (Multiple Primer Extension) 法を応用し、薬剤応答性に関わるSNPsを、迅速に簡便にかつ高感度で検出するシステムの構築を目指している。平成17年度は、MPEX法に関わる諸条件の検討を行い、MPEX法による遺伝子検出における基礎技術の構築を行い、MPEX法による遺伝子検出が現実的に可能であることをまず確認し、プライマーの基板への固定化条件、DNA伸長酵素濃度等の諸条件の検討により、MPEX法による特異性の高い遺伝子検出のための基礎技術の確立を行った、さらにシグナルの可視化技術を確立し、特殊な測定機器を

不要とした簡便な検出手法の開発を行った。上記のようにMPEX法による遺伝子の検出は可能になったが、本MPEX法においては、前処理としてPCRによる、検出対象遺伝子配列を含むDNA鎖の切り出しと増幅が必要であり、PCRによる前処理とMPEX反応の両方を行うため、遺伝子検出に相当の時間を要することとなり、臨床の現場における診断へ適用するには検出時間の短縮が必要であると思われた。平成18年度は、このMPEX法を用いた遺伝子検出に要する時間の短縮を図るため、PCRによる遺伝子の切り出しおよび増幅と、基板上でのMPEX法を同時に行うことを検討した。PCR用チューブ内にミニチップを納めて、一般のPCR用サーマルサイクラーにより、ヒートサイクルをかけ、本PCR&MPEX法により遺伝子の検出が出来ることを確認した。このようにPCR&MPEX法による遺伝子診断の基礎は確立できたが、医療現場にて使用できる、簡便さと迅速さの確保が必要である。最終年度となる今年度は、臨床現場での診断に適応し得る、簡便さと迅速さ(高速性)を確保することを目的として、

高速でヒートサイクルをかけられる、基板専用サーマルサイクラーの開発と、このサーマルサイクラーにおいて、効率よく熱の伝導を行える基板の設計および量産のための射出成形方法の確立、さらには、操作性に優れた基板の設計と試作をおこない、臨床現場での診断に用いることが出来る遺伝子検査システムとして、本PCR&MPEx法を確立する。

B. 研究方法

1. 基板用サーマルサイクラー

基板上でPCRを行うための専用サーマルサイクラーの開発を行った。反応時間の短縮を図るため、ヒートサイクル効率を高いサーマルサイクラーを設計した。従来のチューブ用のサーマルサイクラーは、ヒートブロックの温度を変えてチューブの加熱や、冷却を行うものであるが、ヒートブロックの温度制御に時間がかかるため、ヒートサイクルに要する時間も1サイクルあたり2分程度かかることから、ヒートブロックの温度を変化させない新しい方式を採用することとした。

図2に示すように、PCRでのヒートサイクルの各々の温度に設定したヒート

ブロック(3つ)を用意し、各々のヒートブロックの上を基板が移動する方式のサーマルサイクラーの試作をおこなった。

基板を基板移動用のステージに搭載し、ステージが各温度に設定されたヒートブロック間を移動し、所定の温度に設定されたヒートブロックは、基板を上下からはさみ込み、基板の上下からの加温および冷却することにより、効率よくヒートサイクルをかけられる。

各ヒートブロック間の移動は、シーケンサーにより制御を行うこととした。

今回試作した基板用サーマルサイクラーの基本仕様は、次に示す通りである。

(基板用サーマルサイクラー仕様概要)

- (1) プログラム制御により3ステージ40サイクル以上運転。
- (2) 温度範囲0~200℃
- (3) 移動速度1秒/5m
- (4) 基板を上下のヒーターで加温、上下各々単独で温度制御を行う

2. PCR&MPEx法用基板の設計検討

上記サーマルサイクラーの試作と並行して、基板の仕様の検討を行った。基板には、反応部となるウェル部を儲け、ウ

エル中に反応溶液等を充填し、ウェルにカバーフィルムを被せる方式とした。

基板の試作は、COC基板に窓を設け、COCフィルムと貼り付けることにより、ウェルを形成した基板を試作することとした。

プラスチックは、熱伝導性が悪いことからヒートサイクルを効率良く基板の反応部に伝えるには、ウェル部（反応部）の底部の肉厚を薄くすることが必要である。

ウェル底部の肉厚を検討するにあたり、厚さの異なるフィルムを数種類調達し、ウェル底の厚みが異なる基板を試作した。

ウェル底の厚みによる、スキャナーでのスポットの認識性や、基板全体の剛性等の評価を行い、適切なウェルの底部の厚みを検討した。

3. 射出成形によるPCR&MPEx法用基板の作製検討

本基板の量産化検討のため、射出成形による基板の作製について検討を行った。

基板ウェルの底部の厚さは、熱伝導性を優先させ、図5に示す検討用基板を設計した。ウェル底部の厚さは、当初は0.

1mmを目標とし射出成形用の金型を設計した。実際に射出成形を行い成形品の状況の確認を行い、基板ウェル底部厚みの変更等の検討を行った。

4. 基板ウェル内温度状況の把握

上記射出成形の検討により得た基板を用いて、基板用サーマルサイクラーでの基板上温度サイクルの状況の確認を行った。各ヒートブロックの設定温度とヒートブロックと基板との接触時間と基板ウェル内の温度変化の状況を把握した。

5. 基板上PCR&MPEx反応の検討

本システムによりSNPsの検出が可能か評価実験を行った。ALDH2酵素遺伝子の野生型および変異型を用いSNPsの検出性の評価を行った。

射出成形により得られた基板にMPEx反応用表面処理を施し、図10に示すように、固相化プライマーを、図中に示す配置で基板ウェル底面にスポットし固定化した。

サンプル溶液を調製し、基板ウェル内に分注し、ウェルの上からカバーシールを貼付し、基板用サーマルサイクラーにより、表2に示すようなヒート条件によりPCRおよびMPEx反応を行い、ウ

エル内でのPCRによる遺伝子の増幅状況並びに、MPEX法での特異的な遺伝子の検出性の評価を行った。

6. 操作性改善基板の検討

サンプル溶液のウェルへの分注の後、ウェル上にフィルムシートを貼付けウェルを密閉しサンプル溶液の保持を行ってきたが、本方法では、フィルム貼付の際ウェル内に気泡が残り易く、気泡の混入は、基板上での遺伝子検出特異性の低下につながる。簡単な操作でウェル中へ気泡が入らない基板の検討が必要となった。

鋭意検討を行い、図12に示すように、基板本体とウェルカバーが嵌合するかたちの基板の試作を行った。

試作は、COC樹脂性基板に切削加工を施し、基板本体とカバーを試作した。

C. 研究結果

1. 基板用サーマルサイクラー

当初要求仕様に基づき、基板用サーマルサイクラーの試作を行い、図3に示す装置が完成した。温調部と操作部の2パートよりなる。温調部は、上下3組のヒートブロックを有している。基板はステージに固定され、ステージが水平方向に移動し、各ヒートブロックの位置で停止

し、上に位置するヒートブロックが下降し、ステージ上の基板を上下のヒートブロックにより挟み、加温（冷却）を行う構造となっている。本基板用サーマルサイクラーの一連の動きは、図2に示す通りである。基板固定ステージの動作、各ヒーターの動作等、各動作状況は良好であった。当初の目標仕様を満たした装置を完成することが出来た。

基板ウェル内の温度の状況は図4に示す通りであり、ヒートブロックの温度及び基板とヒートブロックとの接触時間により、PCRにおけるヒートサイクルを再現することが可能であることが確認された。また、1ヒートサイクルあたりの時間も20秒以内で可能であることも確認した。

試作1号機であるため、装置全体の大きさは、やや大きいものとなってしまった。ベッドサイドでの診断に適用するには、小型化の検討が必要であると思われる。

2. PCR&MP EX法用基板の設計検討

本サーマルサイクラー用基板の設計のため、形状検討基板を試作した。スライド状基板の切削加工によりウェル開口部となる窓を形成した基板を作製し、一方、ウェルの底部を形成するフィルムを張り合わせたウェル基板を試作した。

フィルムは、 $100\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}$ 、 $500\mu\text{m}$ の厚さのものをを用いた。熱伝導性は、 $100\mu\text{m}$ のものが良好であり、ヒートブロックの温度への追随性は高かった。

スキャナーでのスポットの検出状況はウェル厚みが $100\mu\text{m}$ のものが良好であった。

以上の結果を踏まえて、射出成形による基板の作製の検討にあたり、ウェル底部の厚みは $100\mu\text{m}$ を目標とすることとした。

3. PCR&MP EX法用基板の射出成形検討

図5の基板設計に基づき、射出成形用の金型を作製した。基板には、耐熱性、

低蛍光性、透明性が必要なことから、COC（飽和環状ポリオレフィン系樹脂）を使用することとした。

基板の成形の結果、ウェル底面が 0.1mm の厚みでは、ウェル底面への樹脂の充填は出来なかった。

ウェル底面への樹脂の充填を改善するため、ウェル底面厚みを 0.2mm に変更し、成形を行ったが、ウェル底面へ樹脂の充填は可能となったが、ウェルドの発生による、ウェル底面の穴の発生が見られた。また、ウェル底面の歪みも発生しており、蛍光マイクロレイスキャナーによる検出も困難であった。

ウェル底面のウェルドの発生を抑えるべく、基板のウェル近くのデザインを変更し、ウェル底部への樹脂の流れを優先するようデザインを変更した結果、ウェル底面でのウェルドの発生はなくなった。また、ウェル底面の歪みもなくなり、蛍光マイクロアレイスキャナーによる検出も可能となった。

4. 射出成形基板による基板上PCR&MPEx法検討

4-1. サーマルサイクラーによる温度精度の確認

まず、ヒートブロックの設定温度と、加熱時間と実際の基板上液相温度の測定を行い、目標とするヒートサイクルが得られるかを確認した。ウェル内にPCR用溶液を満たし、ウェル内に熱電対を挿入しウェル上部から、PCR用のフィルムシールを貼付し、ウェル内の液中の温度変化を測定した。図2に示すように、ヒートブロックの設定温度と実際の液相温度では、20℃程度の差があることがわかった。この差を保つことにより、PCRに必要な温度変化を確保できることが判った。

結果、図4に示すとおり、温度変化の再現性も確保できていることを確認した。

4-2. 遺伝子増幅の確認

ヒトALDH2を組み込んだプラスミド（提供：東京家政大学藤森准教授）を用い、遺伝子増幅実験を実施した。PCR溶液をウェル中に充填した後、溶液の漏れ防止のためPCR用シールフィルムを基板ウェル部分に貼付し、基板用サ

ーマルサイクラーにセットし、ヒートサイクルを付与し、基板上PCRの進行状況を確認した。

ヒートサイクル条件により、遺伝子増幅の度合いは異なるが、図9に示すようにヒートサイクル条件による遺伝子の増幅を確認した。

4-3. 遺伝子検出性の評価

基板上PCR&MPEx法によるSNPs検出性の検討を、上記ヒトALDH2プラスミドを用いて実施した。

基板上に、図11に示すような位置でALDH2の野生型（-/-）および変異型（+/+）検出のためのプライマーをポットし固定化した。

上記ヒートサイクルと同じ条件により、基板上PCR&MPEx法を実施し、SNPsの検出状況を確認した。図11に示すように、各々のSNPsについて特異性のある検出が出来ていることを確認した。

5. 操作性改善基板

5-1. 基板の作製

上記のように、PCR溶液をウェルに充填した後、PCR用フィルムシートを

貼付する方法では、フィルムシール貼付の際ウェル中に気泡を巻き込みやすく、気泡の混入によると思われる、遺伝子増幅反応阻害が確認されていた。

また、フィルムを貼ることは、検査における操作性も悪いことから、図12に示すような、基板本体とカバーを作製することとした。

基板本体とカバーが嵌合する構造とし、嵌合部には、シリコーンゴムを導入し、基板本体とカバーを接着させる構造とした。基板の作製は、COC樹脂製の1mmのスライド基板に切削加工を施すことにより作製することが出来た。

基板本体とカバーをシリコーンゴムにより接着後、溶液注入口から溶液を注入充填し、注入口をシールにより塞ぎ、サーマルサイクラーにてヒートサイクルを付与し、溶液の漏れの有無等を確認した。

ヒートサイクル時の溶液の漏れも観察されずまた、気泡の混入及び発生も観察されなかった。また、反応後カバーの分離及び離脱も容易であり、カバーを外して蛍光スキャナーによるスポットの検出も容易であった。

5-2. 遺伝子検出性の評価

上記4-3と同様に、ウェル内にヒトALDH2検出用野性型および変異型各々のプライマーをスポットし固定化した後、基板本体にカバーを嵌合シリコーンゴムにより接着した。同様にして基板用サーマルサイクラーにより、ヒートサイクルを付与し、基板上PCR&MPEx法によるSNPsの検出を行ったが、射出成形による基板に比較し、シグナルが弱いことができた。

D. 考察

基板上にて、PCRによる遺伝子の増幅とMPEx法による遺伝子の検出を同時に行う方法を検討してきた結果、本方法が、SNPsの検出に有効であり、簡便で高感度検出方法として適用できることが確認された。しかしながら、本方法においては、ベッドサイドでの診断に適用するには、改善しなければならない点があった。

その一つは、反応時間の短縮であった。この、基板上での固相プライマー伸長法によるSNPs検出においては、DNA

の切り出しと増幅が必要である。遺伝子の増幅法には、LAMP法等種々のものがあるが、PCR法が正確に遺伝子の切り出しが行え、同時に行う固相プライマーの伸長反応における特異性も確保しやすいという利点がある。しかし、PCRはヒートサイクルをかける必要があり、このことが、基板上PCR&MPEx法における迅速性の確保の妨げとなっていた。

従来のサーマルサイクラーは、ヒートブロックの温度をペルチェ素子等により、変化させ、ヒートサイクルを加える方法であるが、ヒートブロックの温度を加温や冷却により変化させることは、温度変化に時間を要することとなり、多数回のヒートサイクルを行うには、トータルで長時間の増幅時間を要することとなり、従来のヒートサイクル法では、飛躍的な反応時間の短縮は期待できないと考えられる。

本検討においては、形状が基板状であることから、予め温度設定がされたヒートブロック上を基板が移動する方法を採用することが出来た。今回の試作機においては、各々の設定温度のヒートブロッ

クを上下から挟んで加温する方法により効率良く熱を伝えることが出来た。

基板は、プラスチック製であり熱伝導性が悪く、従来のようなヒートブロックの温度を変化させる方法では、従来のPCRに用いるプロピレン製の容器のように基板をかなりの肉薄にする必要があったと思われるが、本検討による複数温度に設定したヒートブロックを用いる方法では、基板の厚みによる熱伝導性の悪さを加味して、実際に必要な温度よりも、加熱工程では、設定を高め、冷却工程では低めに設定することにより、ヒートサイクルにおける各過程の時間を長くすることなく、ヒートサイクル時間を短く保ったままでの、PCRによる遺伝子の増幅が可能となる。

基板上PCR&MPEx法では、遺伝子の検出確認のために、マイクロアレイ用スキャナーを用いることもあり、基板全体の剛性の確保する必要があり、基板の厚みを薄くするには限度がある。

以上から、本検討における複数の温度設定したヒートブロックを用いるヒートサイクル法は、プラスチック基板を用いたPCRによる増幅法では、最も適した

ヒートサイクル法であると考えられる。

切削加工により作製した基板では、SNPsの検出評価にてシグナル強度が低い結果となった。基板上でのプライマーの伸長反応が進まなかったためと考えられる。プライマーの伸長反応が、何らかの要因によって阻害されたと考えられるが、その要因としては、基板本体とカバー嵌合後の接着に用いた接着剤が酵素を阻害した可能性が高いと考えている。酵素反応を阻害しない接着剤の選択により、克服できると考えられる。

今年度、基板上でPCRとMPEx法を同時に行う基板用サーマルサイクラーと基板を開発し、遺伝子の増幅から検出までを約30分で行うことが出来た。30分という時間は、ベッドサイドにおける検査待ち時間として許容できる範囲であると考えられる。しかしながら、本増幅反応の前に、DNAサンプルの調製が必要なことを考慮すれば、遺伝子の増幅と検出の部分を20分程度以内に納める必要があると考える。血液サンプルから簡便に迅速にDNAを抽出し、PCRによる増幅のための前処理用キットも市販されており、このようなキットとの組み

合わせで一層の簡便化、迅速化が図れるものと考えられる。また、近年、基板に微細流路を設け、流路内で種々の操作や反応を行う研究も進められており、このような、微細流路技術を組み合わせることにより、さらに簡便で迅速、そして極微量なサンプルでSNPsの診断をはじめとする遺伝子診断システムの構築ができると考える。

ベッドサイドにおける臨床検査においては、血液サンプルの採取から検出まで、一貫した閉鎖系で実施できることが、安全性の確保からも必要であり、微細流路基板を用いる検査システムは有用である。

今後、微細流路技術も取り入れ、より迅速、簡便であり、極微量なサンプル量でより安全にSNPs診断を可能とする遺伝子検査システムの構築を行っていきたいと考える。

E. 結論

ベッドサイドでのMPEx法による遺伝子診断を実現するため、基板上PCR&MPEx用サーマルサイクラーの開発及び基板の作製を行った。遺伝子の増幅から検出まで約30分を達成し、操作も

簡便な基板のデザインを実現することにより、MPEX法を基盤とした迅速かつ簡便、高感度なSNPs診断のためのハード面に関する基礎的技術の構築を行うことが出来た。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

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19年度出願

・特願 2007-177200

「遺伝子の検出方法」

・特願 2007-232138

「遺伝子の検出方法」

1-2. 特許登録

なし

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

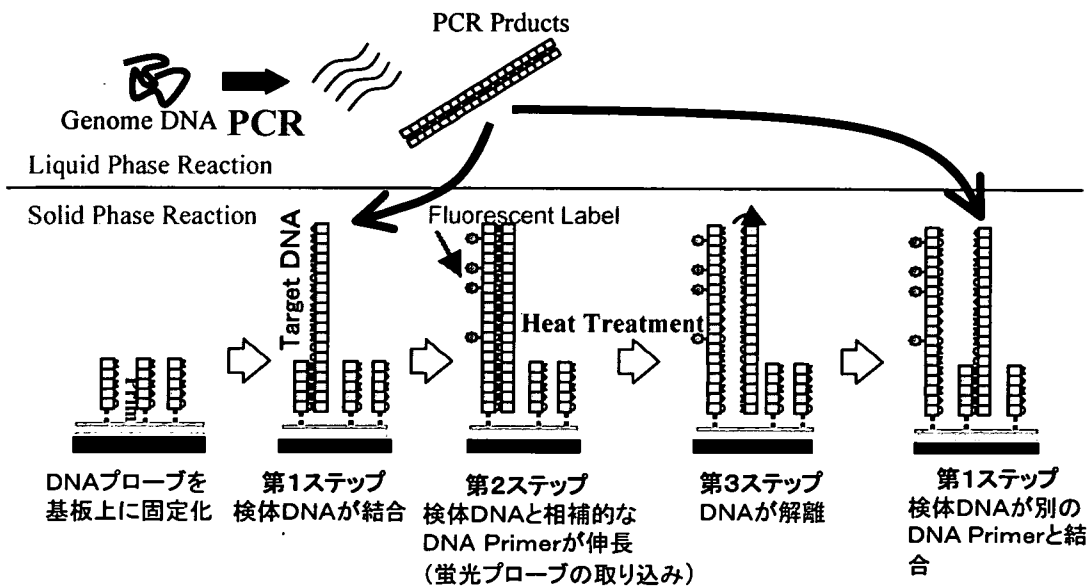
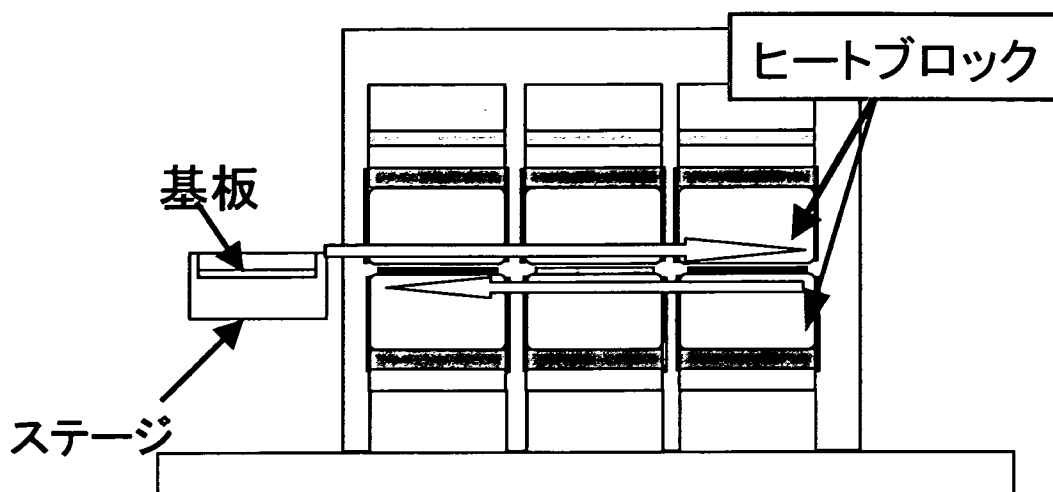


図1 基板上PCR&MPEX原理概念図

基板上にDNAプローブ(プライマー)を固定化し、一方液相中PCRプライマー(センスおよびアンチセンスプライマー)を添加し、ヒートサイクルにより、液相中にてDNAの切り出しと増幅を行い、増幅したDNAが基板に固定化されたプローブにハイブリダイズし、固相DNAプローブ(プライマー)を伸長させる。伸長の際標識が導入され、シグナルとして検出が可能となる。



ヒートブロック	NO. 1	NO. 2	NO. 3
ステージの動き (30サイクル)			
設定温度 °C	118	35	88-90
液温(実測値)°C	99	60	72
加熱時間 秒	2	0.6	10

図2 基板上サーマルサイクラーの動きと温度設定例

各ヒートブロックを変性、アニーリング、伸長反応の各反応工程に対応させた温度に設定し、基板上をヒートブロック上を順番に移動させることにより、ヒートサイクルをかける。基板の熱伝導性を加味し、加熱工程となるNO1およびNO3のヒートブロックは、設定温度を実際の温度より高く設定し、冷却工程となるNO2では設定温度を実際の温度より低くすることにより、短時間でヒートサイクルをかけることが可能となる。

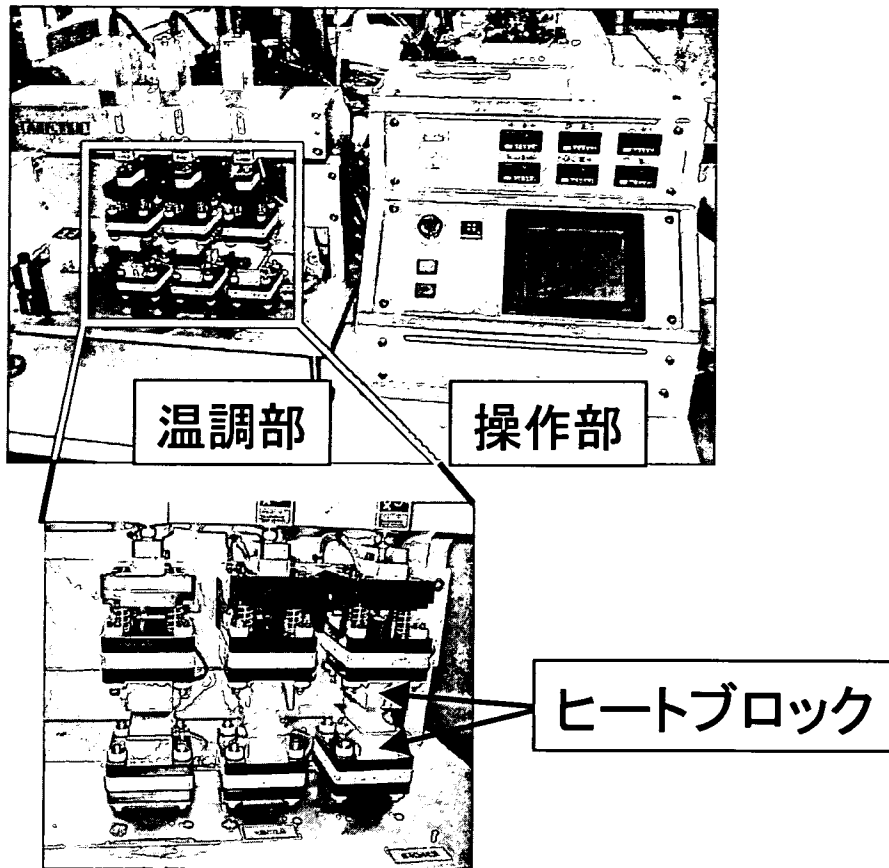


図3基板用サーマルサイクラー試作機

ヒートブロックを上下3セット有する温調部と、温度設定、基板の移動設定の制御を行う操作部よりなる。基板はヒートブロック間を移動し、各ステージにおいて上下からヒートブロックによって基板を加熱(あるいは冷却)する。

表1.ヒートサイクル条件

ステージ1	ヒートブロック(NO1)の設定温度	120℃
	圧着時間(加温時間)	1.2秒
	移動時間	0.5秒
ステージ2	ヒートブロック(NO2)の設定温度	30℃
	圧着時間(加温時間)	2.5秒
	上昇時間	1.0秒
ステージ3	ヒートブロック(NO3)の設定温度	95℃
	圧着時間	0.7秒
	上昇時間	2.0秒

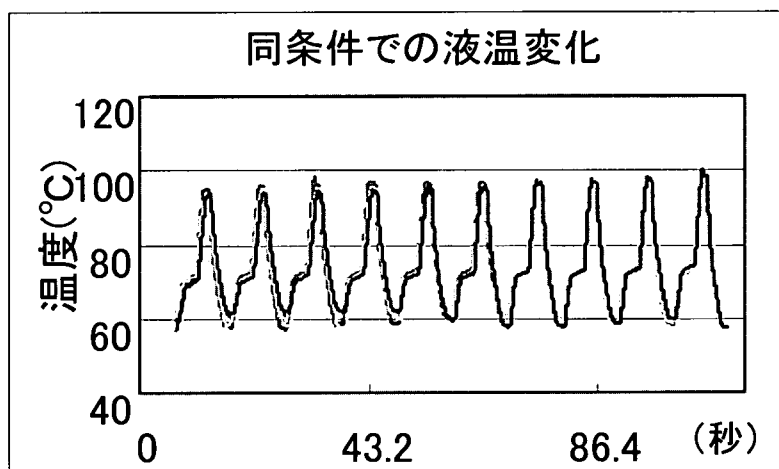


図.4基板上の温度変化及び再現性

表1の条件により、1回あたり10サイクルのヒートサイクルを施した。5回のヒートサイクルを施した際の基板上の液温の変化を示す。5回とも同じ温度変化を示し、再現性が確認された。

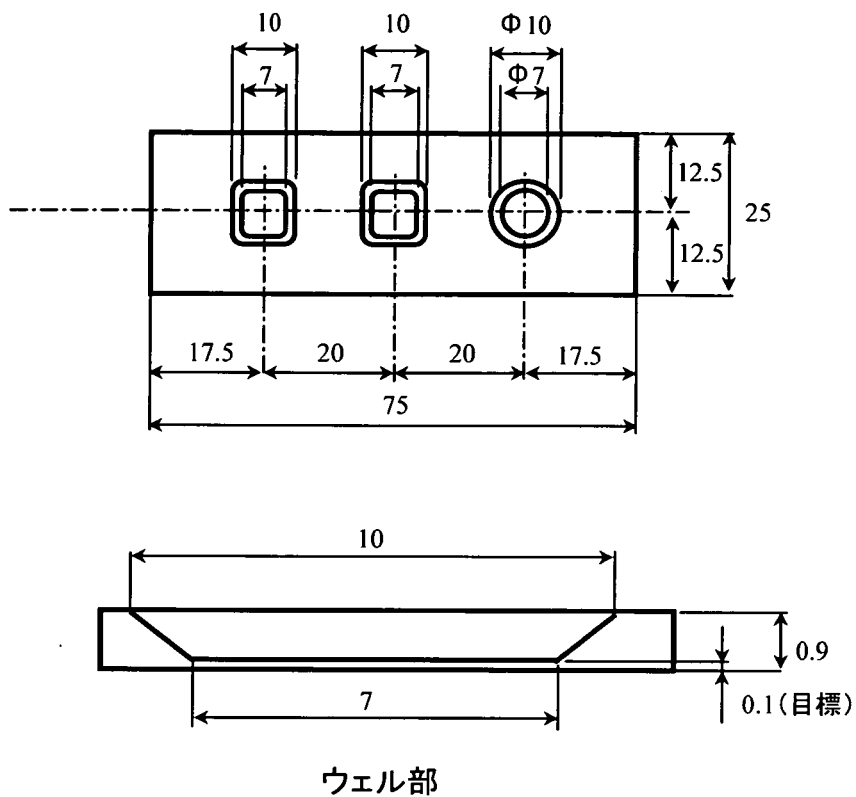
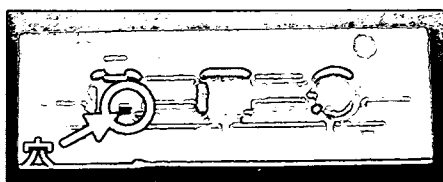


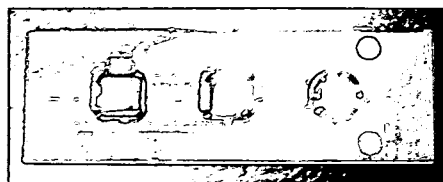
図5成形基板構想図

基板用サーマルサイクラー用基板の射出成形を検討した。ウェル底部の厚さは0.1mmを目標とした。ウェル形状は円形と四角形を準し、成形への影響および操作性の差異を確認することとした。



改良前

表面精度
CV:6~9%
Max-Min:40~60um

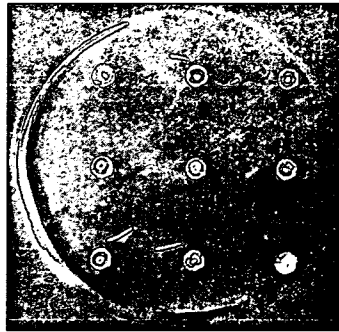


改良後

表面精度
CV:1~3%
Max-Min:10~20um

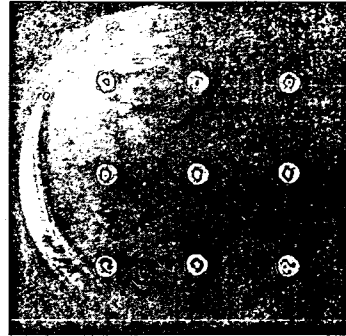
図6金型改良による基板成形性の改善

金型改良前は成形性が悪く、ウェル部に穴ができ、また。表面精度が悪かったが、金型改良により、ウェル部の穴の発生はなくなり、蛍光スキャナーで読み取りが可能なウェルの表面精度を確保することが可能となった。



改良前のウェル基板

シグナルバラツキ
CV:55.6%



改良後のウェル基板

シグナルバラツキ
CV:32.8%

図7成形性の改良によるウェル内スポットシグナルのバラツキへの効果
蛍光スキャナーにより、スポットシグナル強度のバラツキをみた。
スポットシグナル強度のCV値は55.6%⇒32.8%と改善された。

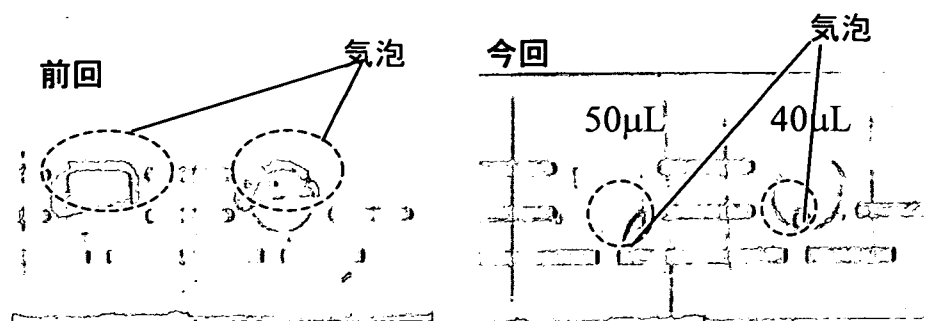


図8 PCR反応時の気泡の発生状況の比較

左は改善前、右が改善後の気泡の発生状況を示す。改善前は、ウェル
いっぱい液を入れるとPCR反応途中で液漏れが生じ半分以上気泡となった
改善後は、ウェルいっぱいの液で反応させても漏れは無くなった。

表.2基板上PCR&MPEXヒートサイクル条件と増幅の結果

		条件1		条件2		条件3		条件4	
		設定温度	保持時間	設定温度	保持時間	設定温度	保持時間	設定温度	保持時間
温度サイクル	ステージ1	94.5°C	15s	94.5°C	15s	110°C	2.5s	110°C	2s
	ステージ2	55°C	7s	60°C	15s	60°C	15s	60°C	14s
	ステージ3	77°C	3.8s	77°C	3.5s	77°C	3.7s	77°C	3.5s
増幅の状況		×:増幅せず		○:増幅		×:増幅せず		○:増幅	
総反応時間				25.6min				17min	

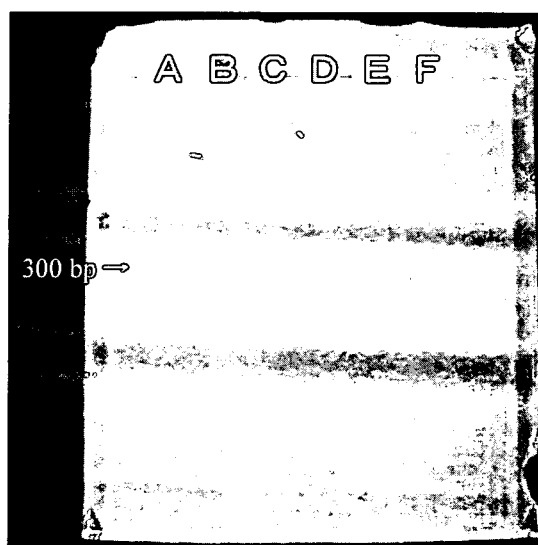


図9 ALDH2プラスミドでの電気泳動像

ALDH2プラスミドを用いて、表2に示す条件で基板上でのPCRを行い電気泳動によりPCR条件による増幅の状況の確認を行った。条件2及び条件4で遺伝子の増幅が認められた。

Lane A: マーカー、Lane B: 通常のPCRによるALDH2PCR産物、
Lane C: 基板上PCR(条件1)、Lane D: 基板上PCR(条件2)、
Lane E: 基板上PCR(条件3)、Lane F: 基板上PCR(条件4)