

表 4 HLA-DRB1\*1302 の特異的検出

HLA-DRB1			HLA-DRB1				
No.	allele		検出開始時間 (分)	No.	allele		検出開始時間 (分)
01	DRB1*0901	DRB1*1302	29.56	15	DRB1*1101	DRB1*1405	No Amp.
02	DRB1*0101	DRB1*1302	32.41	16	DRB1*0405	DRB1*1401	No Amp.
03	DRB1*1302	DRB1*1401	30.41	17	DRB1*0101	DRB1*0406	No Amp.
04	DRB1*0803	DRB1*1302	29.3	18	DRB1*0701	DRB1*0701	No Amp.
05	DRB1*1201	DRB1*1302	27.34	19	DRB1*1501	DRB1*1501	No Amp.
06	DRB1*1302	DRB1*1302	25.02	20	DRB1*1201	DRB1*1502	No Amp.
07	DRB1*1302	DRB1*1502	28.25	21	DRB1*0401	DRB1*0401	No Amp.
08	DRB1*1302	DRB1*1501	26.68	22	DRB1*1402	DRB1*1402	No Amp.
09	DRB1*1302	DRB1*0410	32.06	23	DRB1*0803	DRB1*0803	No Amp.
10	DRB1*1502	DRB1*1502	No Amp.	24	DRB1*0901	DRB1*0901	No Amp.
11	DRB1*0405	DRB1*0405	No Amp.	25	DRB1*0403	DRB1*0405	No Amp.
12	DRB1*0410	DRB1*1501	No Amp.	26	DRB1*0802	DRB1*0803	No Amp.
13	DRB1*1202	DRB1*1502	No Amp.	27	DRB1*0403	DRB1*1405	No Amp.
14	DRB1*0802	DRB1*1001	No Amp.	28	DRB1*0406	DRB1*1403	No Amp.

表中の No Amp. (No Amplification)は、60 分の反応時間内に増幅が見られなかったことを示す。

表 5 HLA-DQB1\*0604 の特異的検出

HLA-DQB1			HLA-DQB1				
No.	allele		検出開始時間 (分)	No.	allele		検出開始時間 (分)
01	DQB1*0303	DQB1*0604	18.14	16	DQB1*0501	DQB1*0303	No Amp.
02	DQB1*0301	DQB1*0604	16.3	17	DQB1*0301	DQB1*0503	No Amp.
03	DQB1*0501	DQB1*0604	20.64	18	DQB1*0303	DQB1*0503	No Amp.
04	DQB1*0401	DQB1*0604	32.29	19	DQB1*0402	DQB1*0301	No Amp.
05	DQB1*0604	DQB1*0503	20.57	20	DQB1*0401	DQB1*0303	No Amp.
06	DQB1*0601	DQB1*0604	17.61	21	DQB1*0401	DQB1*0402	No Amp.
07	DQB1*0604	DQB1*0604	16.55	22	DQB1*0202	DQB1*0202	No Amp.
08	DQB1*0604	DQB1*0602	18.22	23	DQB1*0301	DQB1*0301	No Amp.
09	DQB1*0604	DQB1*0402	18.95	24	DQB1*0401	DQB1*0601	No Amp.
10	DQB1*0601	DQB1*0601	No Amp.	25	DQB1*0601	DQB1*0502	No Amp.
11	DQB1*0401	DQB1*0602	No Amp.	26	DQB1*0302	DQB1*0401	No Amp.
12	DQB1*0501	DQB1*0601	No Amp.	27	DQB1*0402	DQB1*0601	No Amp.
13	DQB1*0301	DQB1*0601	No Amp.	28	DQB1*0302	DQB1*0503	No Amp.
14	DQB1*0601	DQB1*0303	No Amp.	29	DQB1*0303	DQB1*0303	No Amp.
15	DQB1*0302	DQB1*0601	No Amp.				

表中の No Amp. (No Amplification)は、60 分の反応時間内に増幅が見られなかったことを示す。

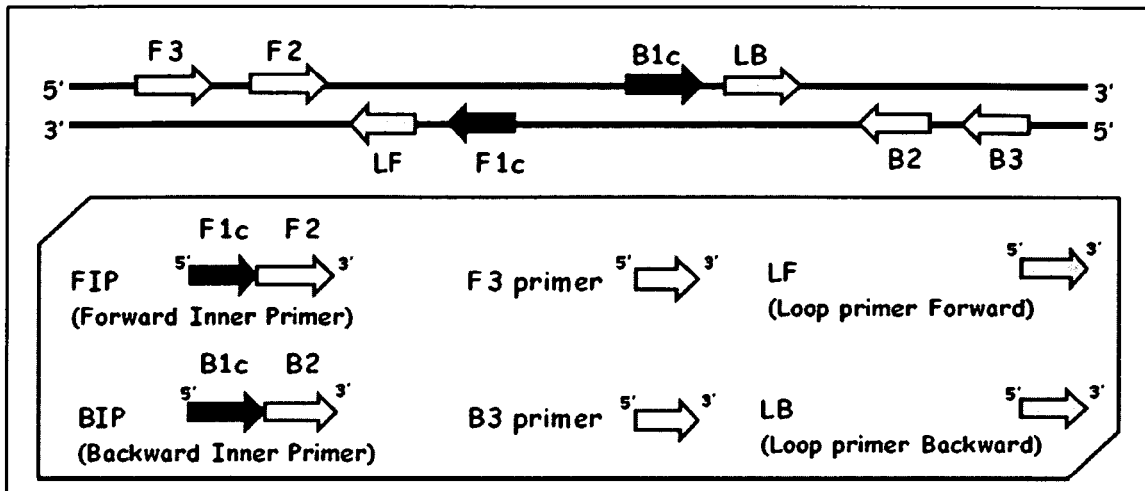


図1 LAMP プライマーの位置

LAMP 反応は 8 領域[F1c(F1 領域の相補配列)、B1c(B1 領域の相補配列)、F2、B2、F3、B3、LF および LB]からなる 6 種類のプライマー(FIP、BIP、F3、B3、LF および LB)を用いておこなう。

Grouping of DRB1 alleles	primer
*0101	DR1
*1501,1502,1602	DR2
*0301,1301,1302,1402,1403,1406	DR36
*0401,0403,0404,0405,0406,0407,0410	DR4
*1101,1307	DR11
*1201,1202	DR12
*1401,1405,1407	DR14
*0701	DR7
*0802,0803	DR8
*0901	DR9
*1001	DR10

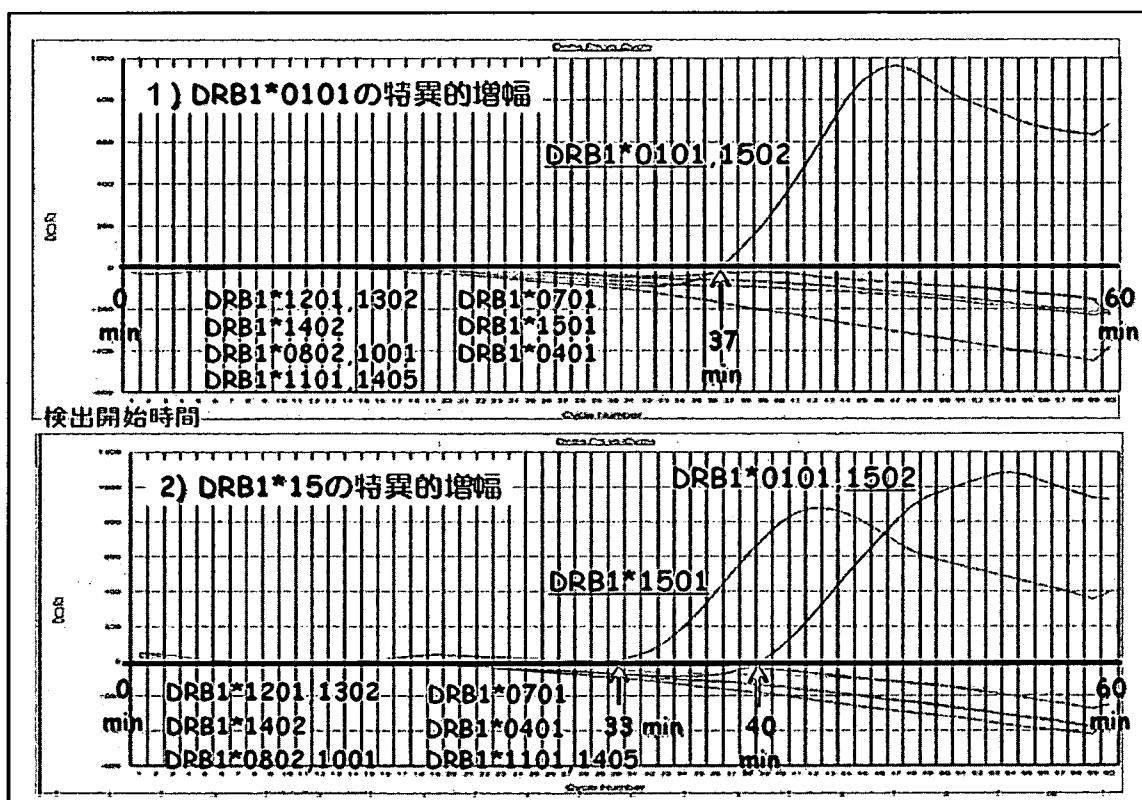


図2 HLA-DRB1 アリルにおけるグループ分けおよび各群の特異的増幅曲線

縦軸は二本鎖 DNA に結合した SYBR GreenI 由来の蛍光強度、横軸は反応時間 (分) である(以下同じ)。

HLA-DRB1 アリルを 11 群のグループに分けた。

HLA アリルが既知の DNA サンプルを用いてリアルタイム LAMP 反応をおこない、各群において特異的な増幅が認められた。表中の時間(37 分、33 分、40 分)は、60 分間の反応において、陽性シグナルが検出された開始時間を示している。

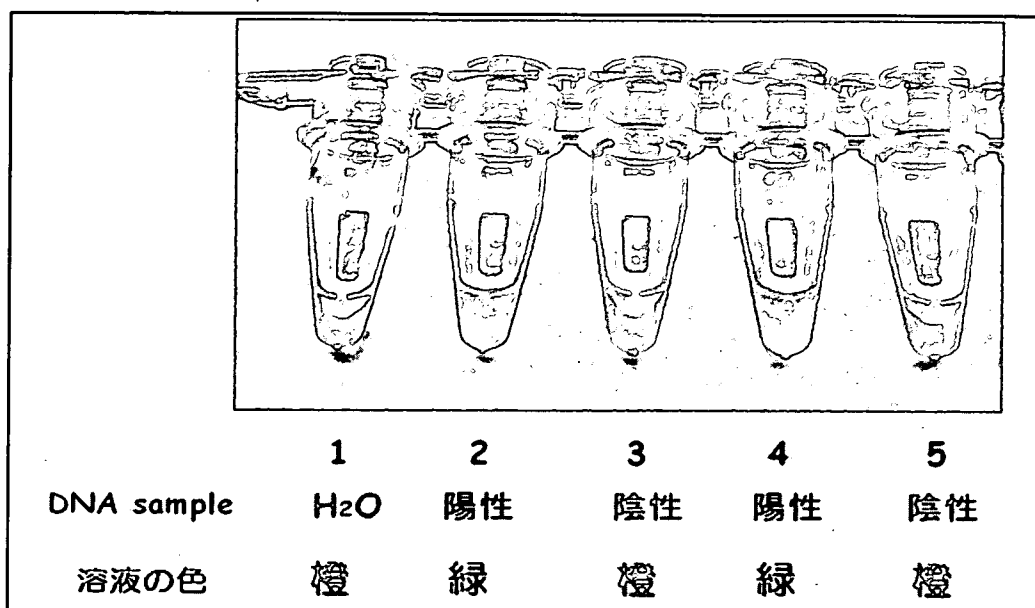


図3 HLA-DRB1 アリルにおける SYBR GreenI 滴下による目視判定

SYBR GreenI を滴下し、反応溶液の色が緑色になると陽性、オレンジ色になると陰性を示す。

本実験において、陽性サンプルを鋳型にした反応溶液は緑色になり陽性を示し、陰性サンプルを鋳型にした反応溶液はオレンジ色に変わり陰性を示した。

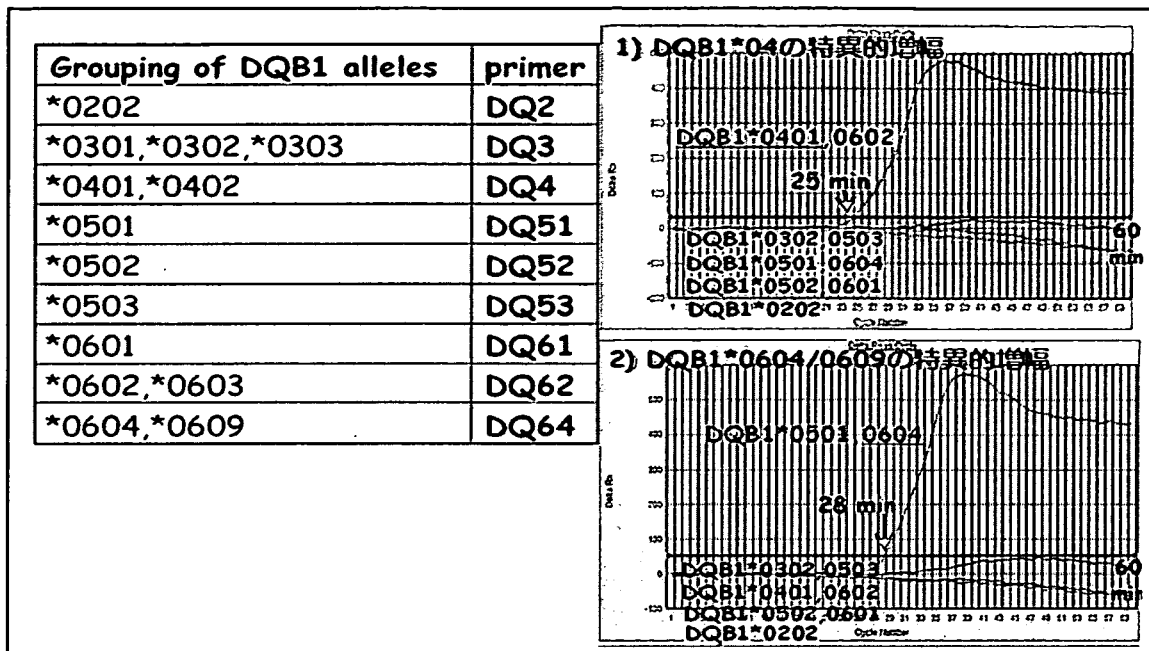


図4 HLA-DQB1 アリルにおけるグループ分けおよび各群の特異的増幅曲線  
HLA-DQB1 アリルを9群のグループに分けた。

HLA アリルが既知の DNA サンプルを用いてリアルタイム LAMP 反応をおこない、各群において特異的な増幅が認められた。

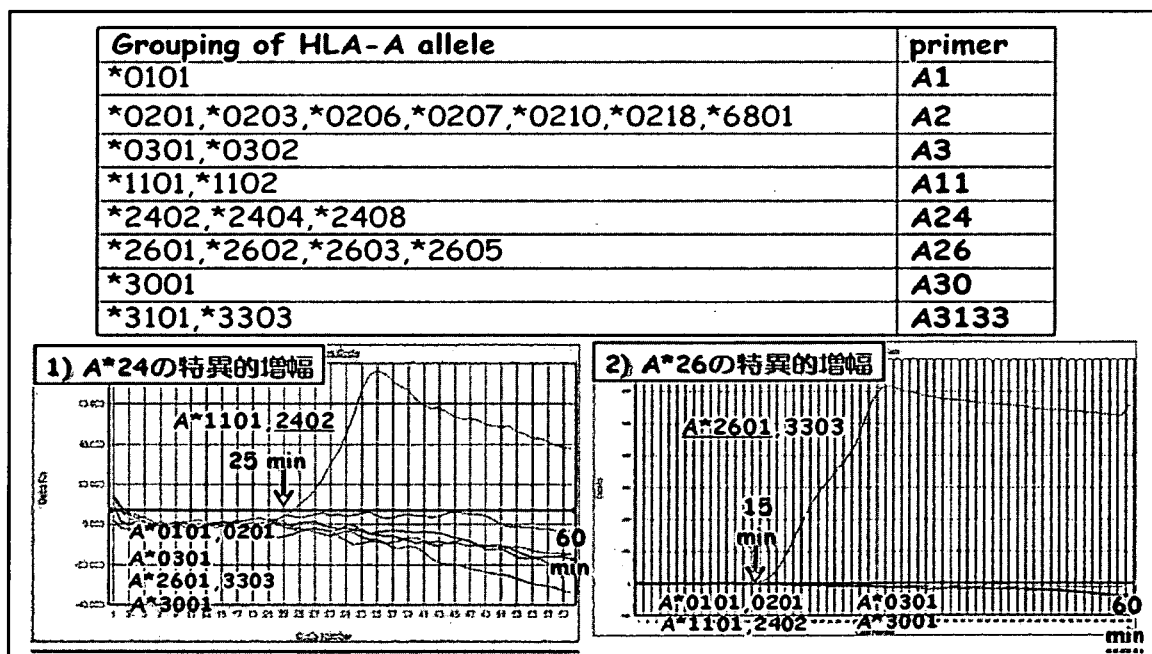


図5 HLA-A アリルにおけるグループ分けおよび各群の特異的増幅曲線  
HLA-A アリルを8群のグループに分けた。

HLA アリルが既知の DNA サンプルを用いてリアルタイム LAMP 反応をおこない、各群において特異的な増幅が認められた。

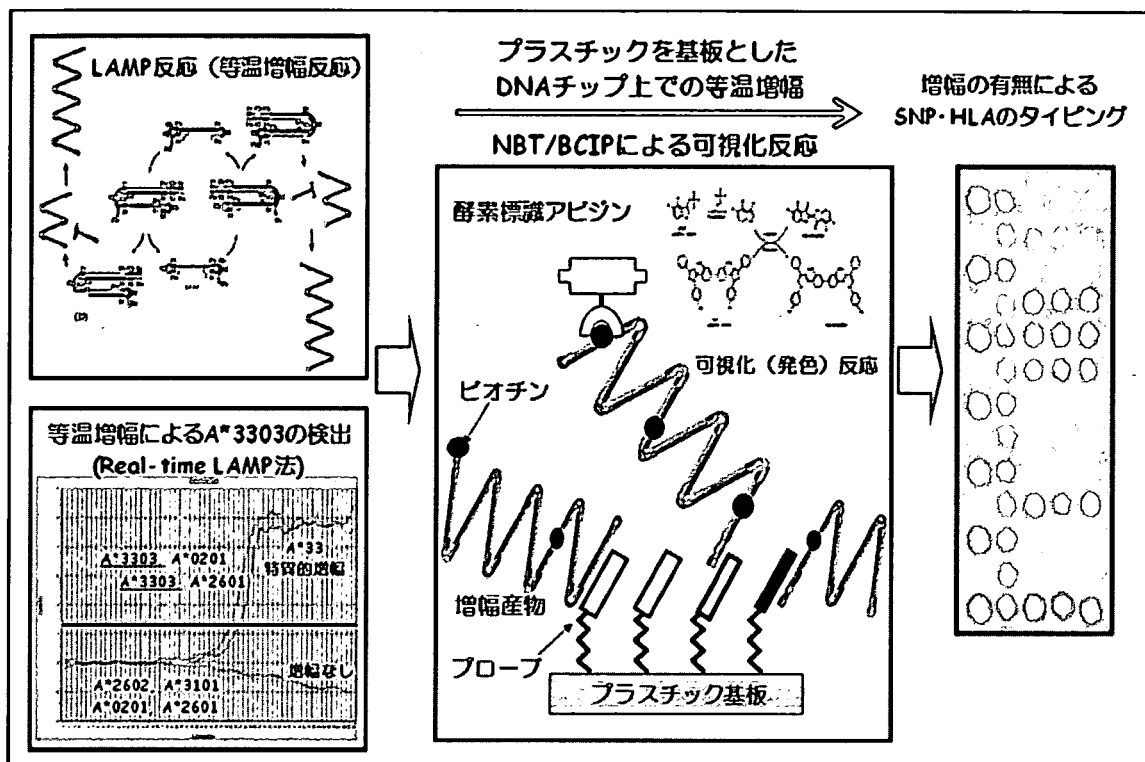


図6 プラスチックを基板としたDNAチップ上でのSNP-HLAのタイピング

一定温度(60-65°C)下で、プラスチック基板上に展開した反応溶液(液相)内でLAMP反応による標的領域の特異的増幅が生じ、一方、プラスチック基板上に固定したオリゴDNAに(固相)増幅産物内の相補領域がハイブリダイズし、ビオチン標識したヌクレオチドdUTPが取り込まれながら伸長反応(MPEX反応)が生じる。反応終了後、オリゴDNA上に伸長したDNA鎖中のビオチンをNBT/BCIPによる可視化反応により検出することで、増幅の有無を目視により判定する。

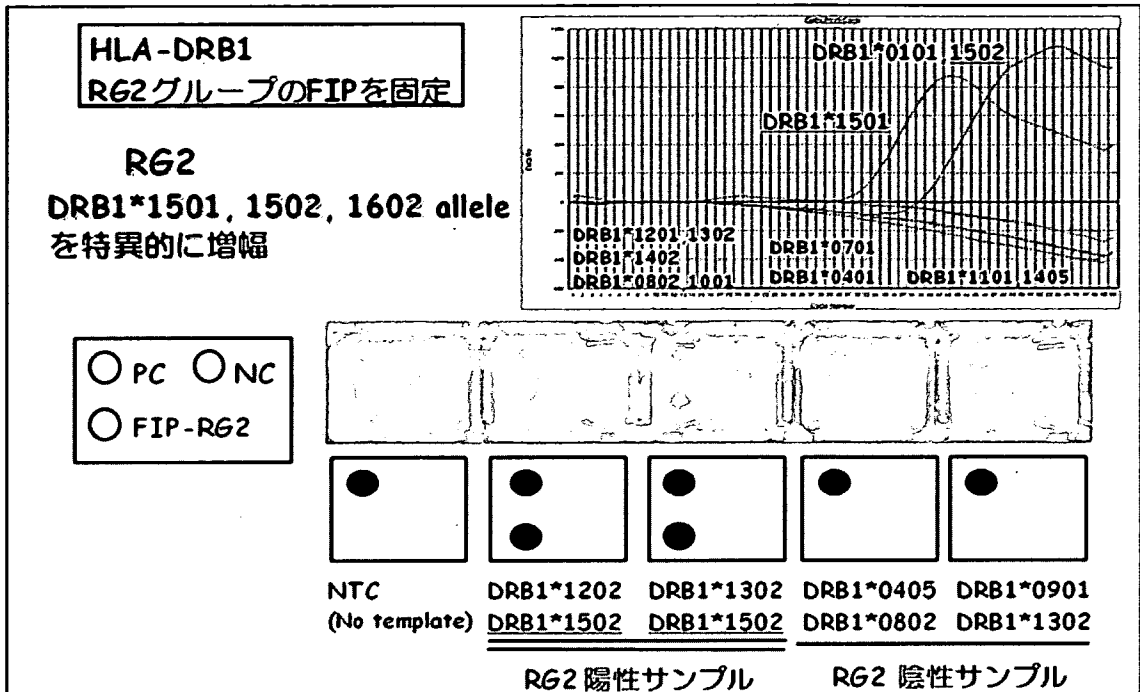


図 7 LAMP-FIP プライマー固定における標的アレルの検出

HLA-DRB1 において 11 群に分けたグループの一つ、RG2 (HLA-DRB1\*1501, 1502, 1602 アレルを特異的に増幅する) についておこなった。RG2 特異的に増幅するプライマーの有用性は、上記のリアルタイム LAMP 反応において増幅曲線による判定で認められた。

プラスチック基板上に RG2 特異的 LAMP プライマーの FIP プライマーをプローブとして固定化し、LAMP 反応をおこなった。その結果、RG2 陽性サンプルにおいてのみ、RG2 特異的 FIP プローブ (FIP-RG2) に陽性シグナルを示した。

PC は陽性オリゴ、NC は陰性オリゴである。



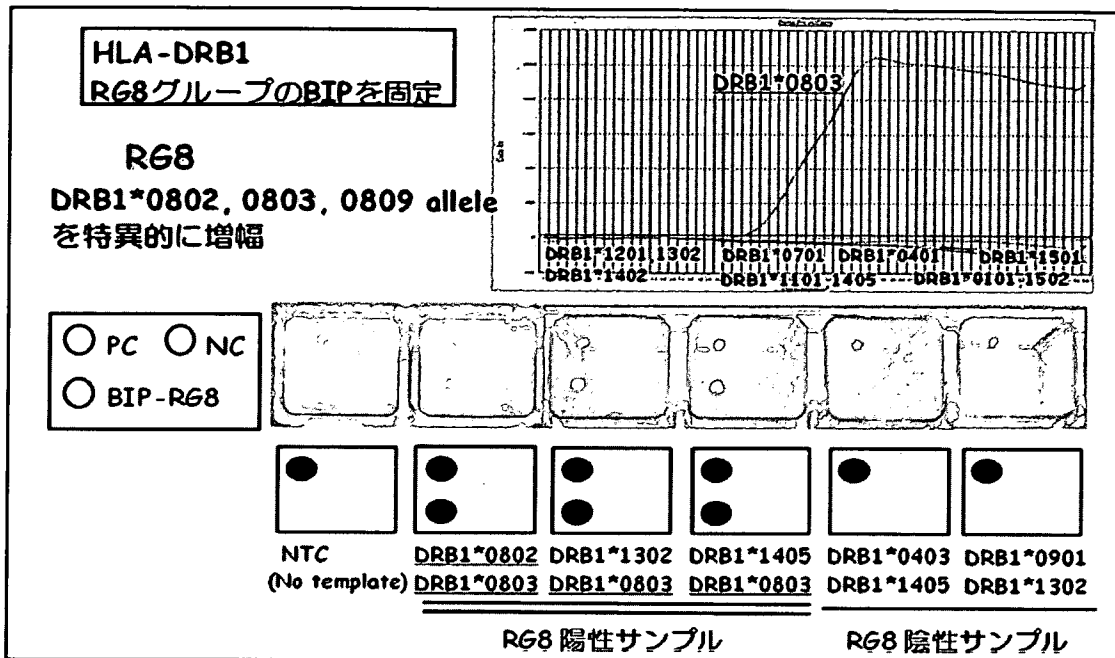


図 8 LAMP-BIP プライマー固定における標的アリの検出

HLA-DRB1 において RG8 群 (HLA-DRB1\*0802, 0803, 0809 アリルを特異的に増幅する) についておこなった。RG8 特異的プライマーの有用性は、上記のリアルタイム LAMP 反応において増幅曲線による判定で認められた。

プラスチック基板上に RG8 特異的 LAMP プライマーの BIP プライマーをプローブとして固定化し、LAMP 反応をおこなった。その結果、RG8 陽性サンプルにおいてのみ、RG8 特異的 BIP プローブ (BIP-RG8) に陽性シグナルを示した。

PC は陽性オリゴ、NC は陰性オリゴである。

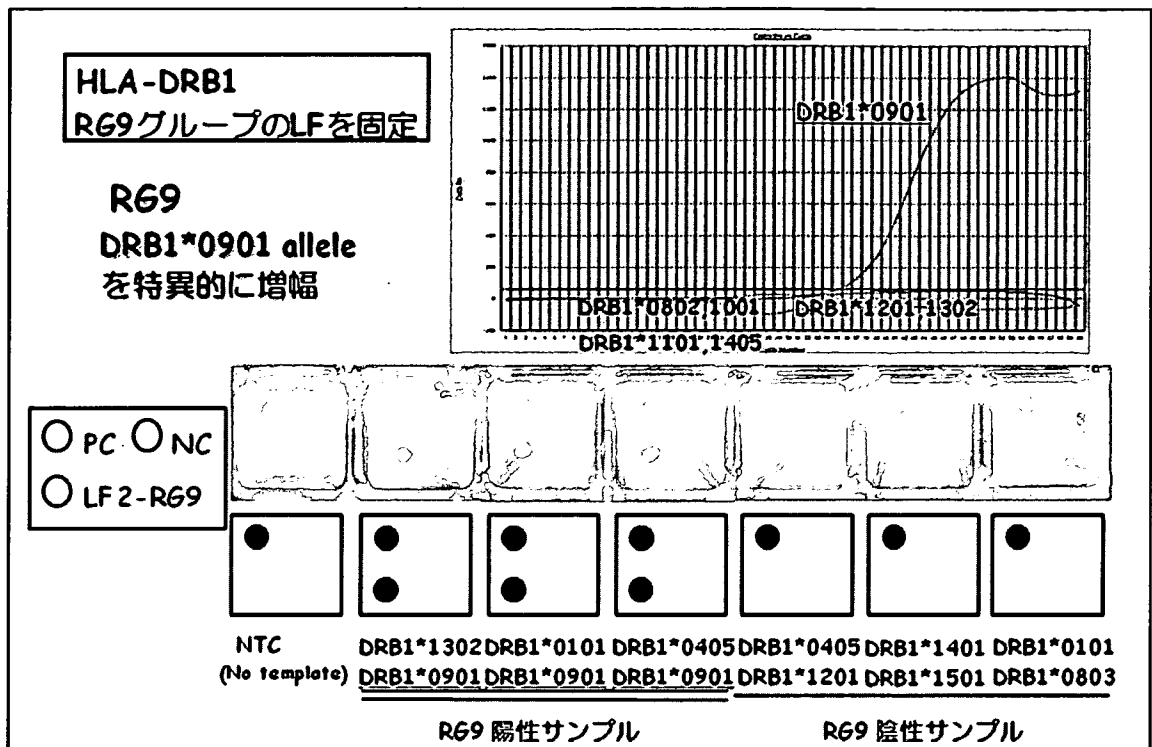


図9 LAMP-LF プライマー固定における標的アリの検出

HLA-DRB1 において RG9 群 (HLA-DRB1\*0901 アリルを特異的に増幅する) についておこなった。RG9 特異的プライマーの有用性は、上記のリアルタイム LAMP 反応において増幅曲線による判定で認められた。

プラスチック基板上に RG9 特異的 LAMP プライマーの LF プライマーをプローブとして固定化し、LAMP 反応をおこなった。その結果、RG9 陽性サンプルにおいてのみ、RG9 特異的 LF プローブ (LF2-RG9) に陽性シグナルを示した。

PC は陽性オリゴ、NC は陰性オリゴである。

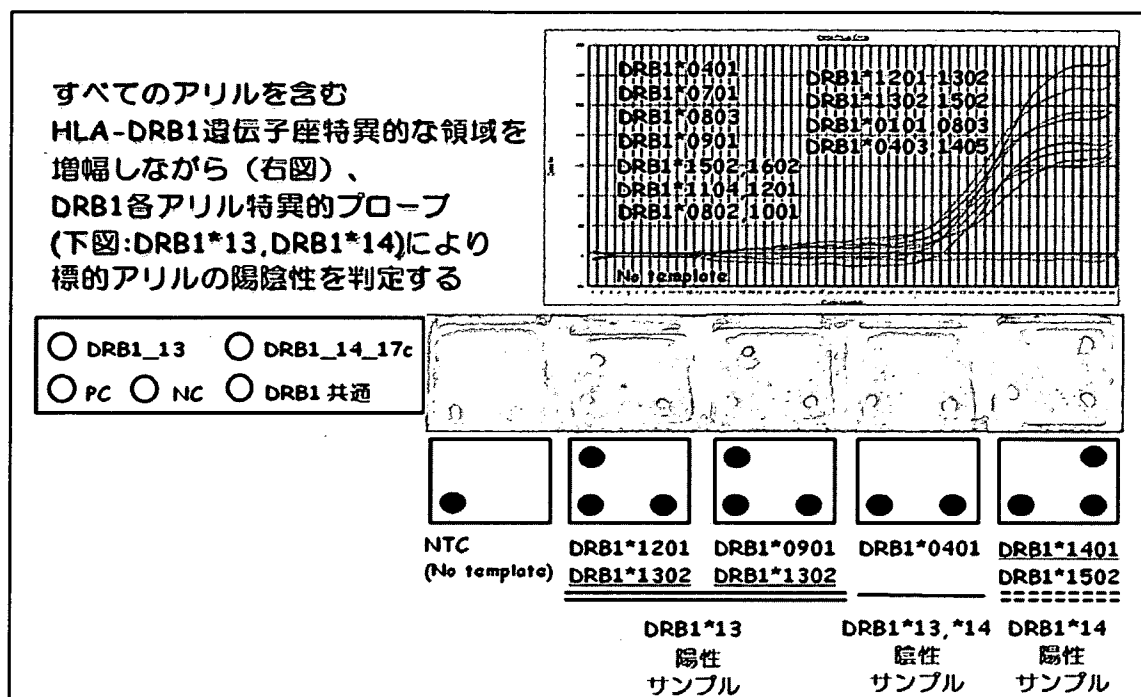


図 10 DRB1 各アリル特異的オリゴ固定におけるアリルタイピング

エクソン 2 領域において、すべてのアリルを含む HLA-DRB1 遺伝子座特異的な領域を増幅させるような LAMP プライマーを設計し、上記のリアルタイム LAMP 法にてプライマーの有用性を明らかにした。HLA-DRB1\*13 および HLA-DRB1\*14 特異的プローブを固定したプラスチック基板上において、HLA-DRB1 遺伝子座特異的な領域を LAMP 法にて増幅し、MPEX 反応により伸長をおこなった。その結果、HLA-DRB1\*13 陽性サンプルは、DRB1\*13 特異的プローブ (DQB1\_13) にのみ陽性シグナルを示し、HLA-DRB1\*14 陽性サンプルは、DRB1\*14 特異的プローブ (DQB1\_14\_17c) にのみ陽性シグナルを示した。

PC は陽性オリゴ、NC は陰性オリゴである。

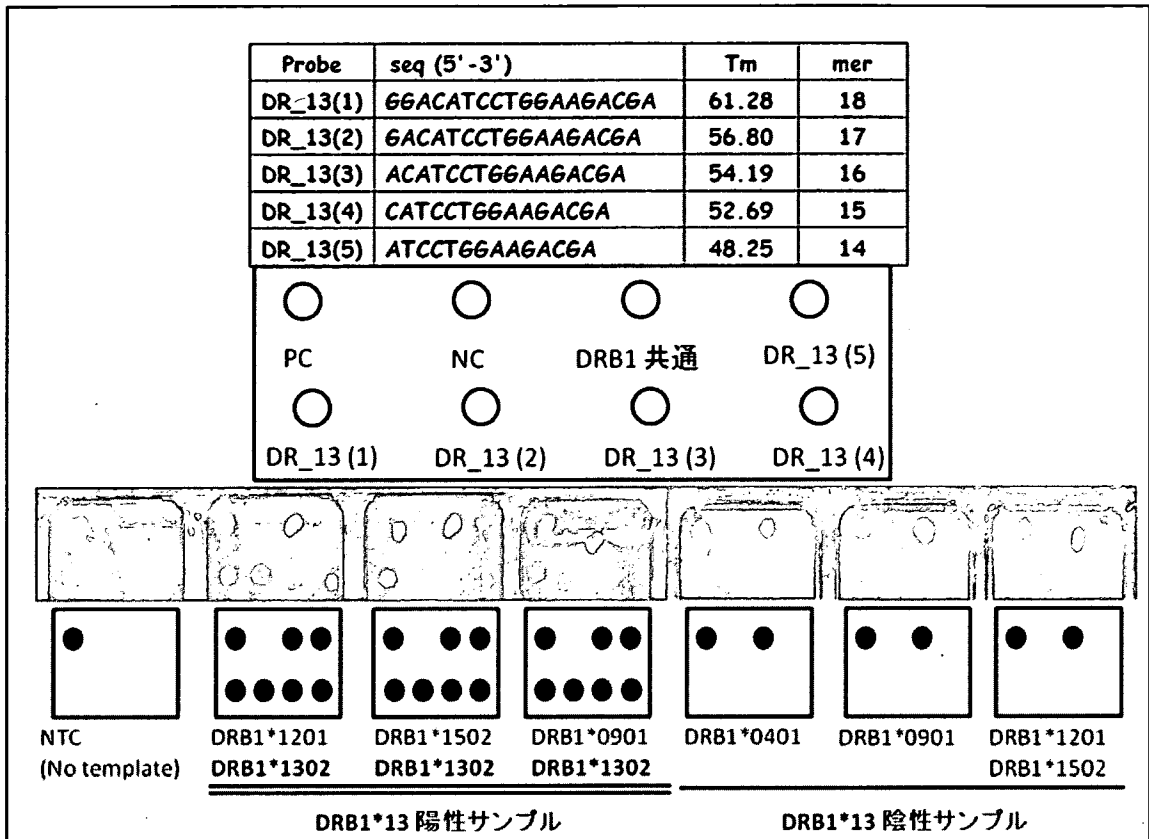


図 11 DRB1\*13 アリル特異的オリゴの特異性およびシグナル強度の検討

HLA-DRB1\*13 特異的オリゴ DNA について、長さおよび Tm 値の違いによる検出能の特異性および陽性シグナルの強度の変化を検討した。

プラスチック基板上において、エクソン 2 領域の HLA-DRB1 遺伝子座特異的な共通領域を増幅させ、HLA-DRB1\*13 オリゴ DNA プローブを用いて陽性シグナルを検出した。その結果、HLA-DRB1\*13 陽性サンプルにおいてのみ、DRB1\*13 オリゴ DNA にシグナルが認められた。そして、オリゴ DNA の長さが短くなり、Tm 値が低くなるのに伴って、得られたシグナル強度が低下することが明らかとなった。

PC は陽性オリゴ、NC は陰性オリゴである。

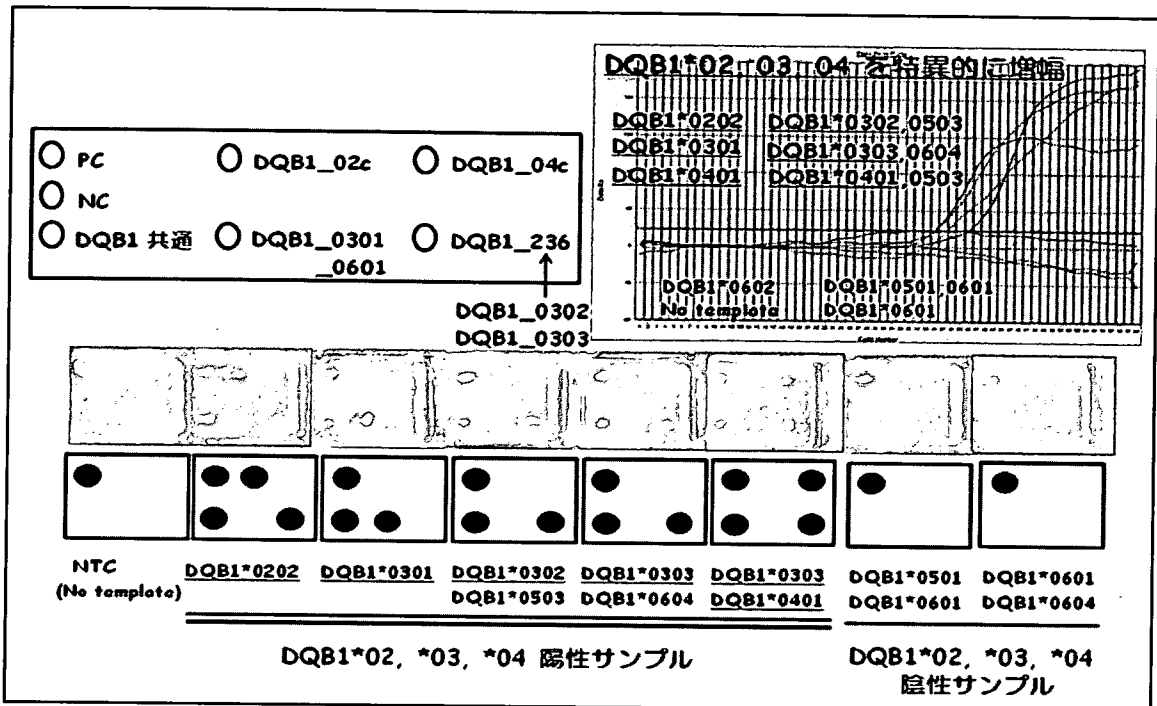


図 12 DQB1\*02,\*03,\*04 各アレル特異的オリゴ固定におけるアレルタイピング  
 エクソン 2 領域において、DQB1\*02、\*03、\*04 アレルを特異的に増幅させる共通の LAMP プライマーを設計し、上記のリアルタイム LAMP 反応によりプライマーの有用性を明らかにした。プラスチック基板の上に DQB1\*02 特異的オリゴ DNA (DQB1\_2c)、DQB1\*0301 特異的オリゴ DNA (DQB1\_0301\_0601)、DQB1\*0302 および\*0303 特異的オリゴ DNA (DQB1\_236)、DQB1\*04 特異的オリゴ DNA (DQB1\_04c)を固定した。その結果、DQB1\*02、\*03、\*04 陽性サンプルにおいてのみ、各アレル特異的オリゴ DNA に陽性シグナルが認められた。  
 PC は陽性オリゴ、NC は陰性オリゴである。

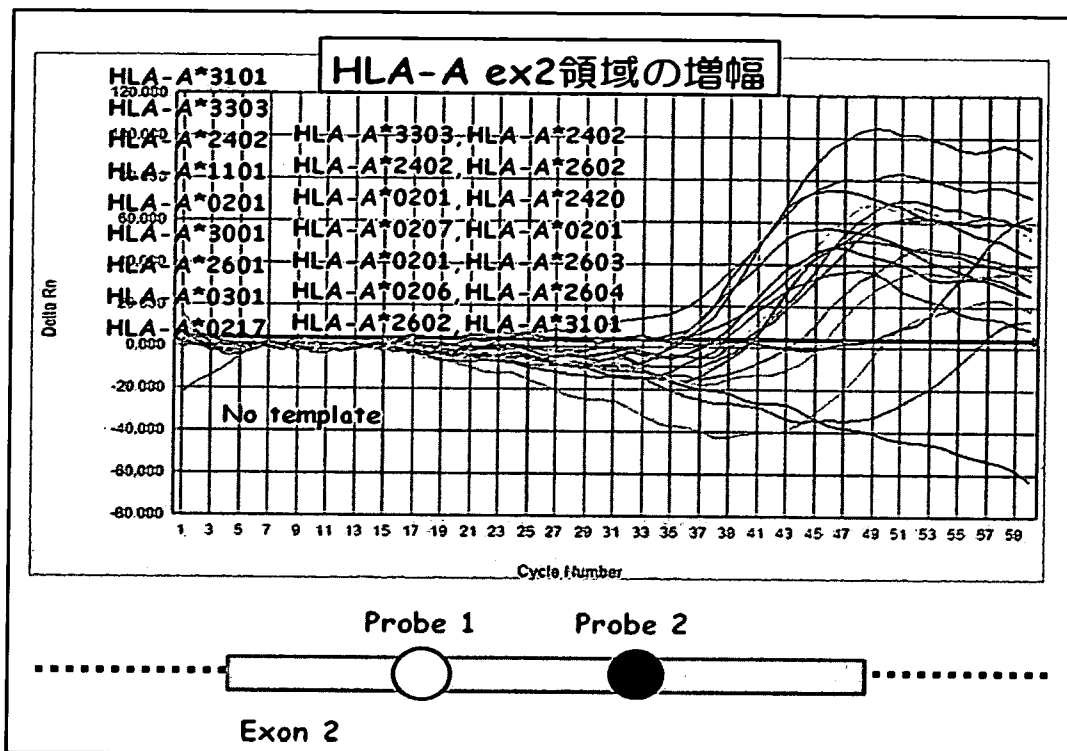


図 13 LAMP 反応による HLA-A 遺伝子座共通領域の増幅および  
エクソン 2 領域における HLA-A\*3303 検出用オリゴ DNA プローブの位置

エクソン 2 領域において、すべてのアレルを含む HLA-A 遺伝子座特異的な領域を増幅させる LAMP プライマーを設計し、上記のリアルタイム LAMP 反応によりプライマーの有用性を明らかにした。

HLA-A\*3303 検出用オリゴ DNA プローブを HLA-A\*3303 特異的な多型領域の 2 カ所に設定し、両方のオリゴ DNA に陽性シグナルが得られると HLA-A\*3303 陽性であるという判定をおこなう。

**Probe 1**

Probe name	seq (5'-3')	Tm
A33 e2_P2	TTGGGACC <u>GGA</u> CACAC	63.22
A33 e2_P3	TGGGACC <u>GGA</u> CACAC	61.75
A33 e2_P4	GGGACC <u>GGA</u> CACAC	58.03
A33 e2_P7	GAGTATTGGGACC <u>GGA</u> CAC	63.10
A33 e2_P9	GTATTGGGACC <u>GGA</u> CAC	60.20
A33 e2_P12	TTGGGACC <u>GGA</u> CAC	58.75
A33 e2_P16	GGAGTATTGGGACC <u>GGA</u> C	63.08
A33 e2_P17	GAGTATTGGGACC <u>GGA</u> C	59.29
A33 e2_P18	AGTATTGGGACC <u>GGA</u> C	57.12

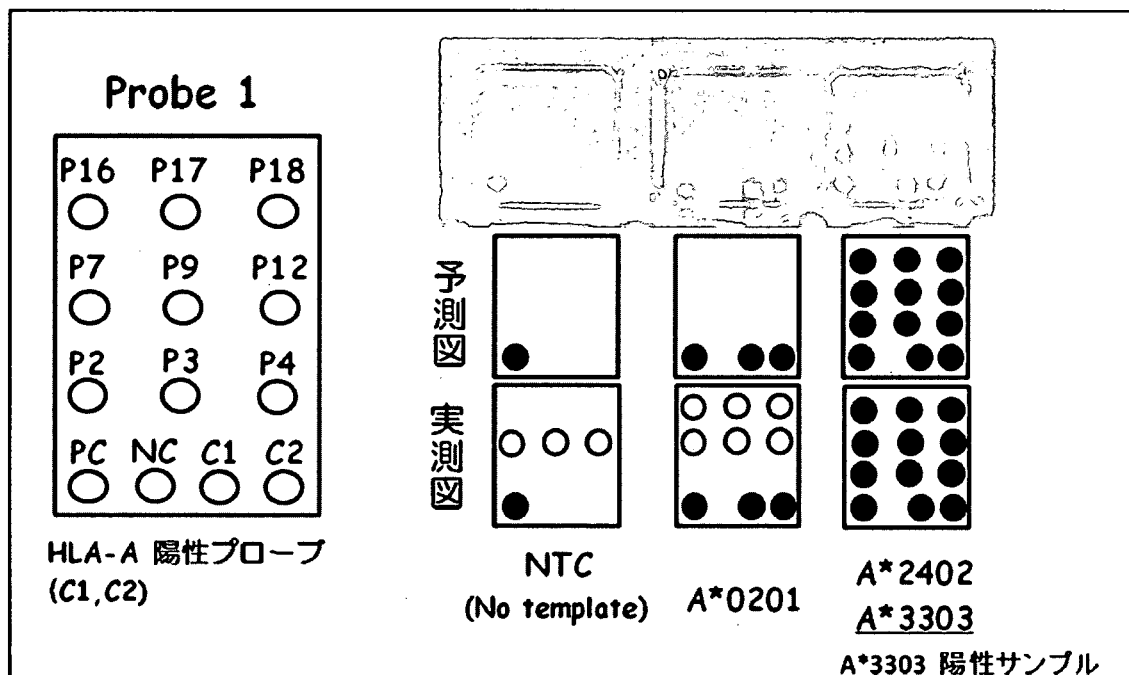


図 14-1 HLA-A\*3303 アリル特異的オリゴ固定におけるアリルタイピング (Probe 1)

上段には、プラスチック基板上に固定した各オリゴ DNA の塩基配列および Tm 値を示している。また、塩基配列内の下線付き塩基は HLA-A\*3303 特異的な多型である。

下段には、各オリゴ DNA の固定位置を示しており、C1 および C2 は、HLA-A 内部陽性オリゴ DNA である。PC は陽性オリゴ、NC は陰性オリゴである。

実測図において示した灰色の○は、鑄型なしの反応系においてまたは陰性サンプルにおいて認められた非特異的なシグナルである。

**Probe 2**

Probe name	seq (5'-3')	Tm
A33 e2_P20	GGCCCACTCACAGATTGAC	63.27
A33 e2_P21	GCCCACTCACAGATTGAC	59.12
A33 e2_P22	CCCACTCACAGATTGAC	54.10
A33 e2_P24	GAAGGCCCACTCACAGATTG	64.62
A33 e2_P25	AAGGCCCACTCACAGATTG	62.74
A33 e2_P27	GGCCCACTCACAGATTG	60.22
A33 e2_P30	TGAAGGCCCACTCACAGAT	63.39
A33 e2_P31	GAAGGCCCACTCACAGAT	60.23
A33 e2_P33	AGGCCCACTCACAGAT	56.09

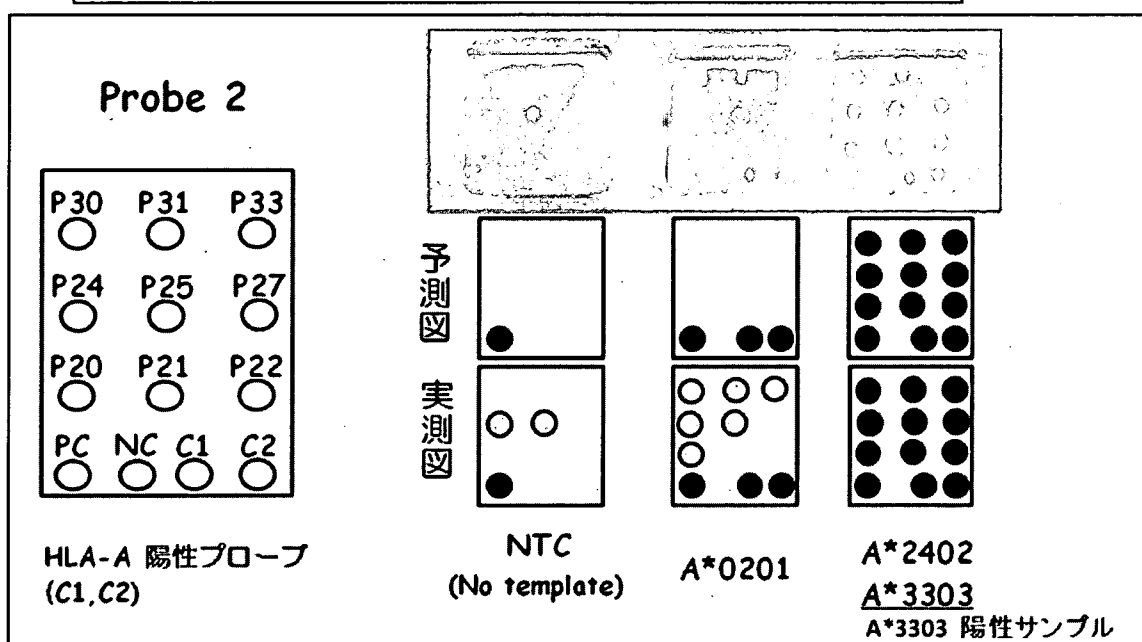


図 14-2 HLA-A\*3303 アリル特異的オリゴ固定におけるアリルタイピング (Probe 2)

上段には、プラスチック基板上に固定した各オリゴ DNA の塩基配列および Tm 値を示している。また、塩基配列内の下線付き塩基は HLA-A\*3303 特異的な多型である。

下段には、各オリゴ DNA の固定位置を示しており、C1 および C2 は、HLA-A 内部陽性オリゴ DNA である。PC は陽性オリゴ、NC は陰性オリゴである。

実測図において示した灰色の○は、鋳型なしの反応系においてまたは陰性サンプルにおいて認められた非特異的なシグナルである。



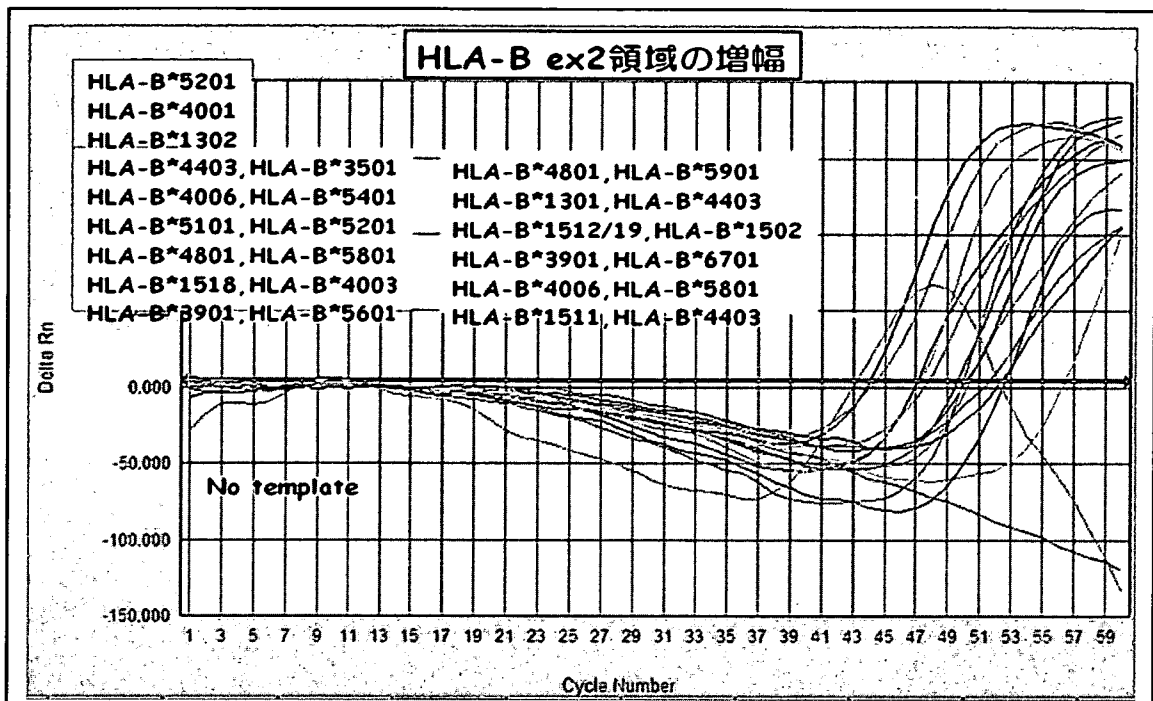


図 15 LAMP 反応による HLA-B 遺伝子座共通領域の増幅

エクソン 2 領域において、すべてのアレルを含む HLA-B 遺伝子座特異的な領域を増幅させる LAMP プライマーを設計し、上記のリアルタイム LAMP 反応によりプライマーの有用性を明らかにした。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
記載内容なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
記載内容なし					