

図3. MPEX伸長反応時間依存性

37℃一定条件で、MPEX伸長反応時間と蛍光シグナル量の関係を調べた。その結果、反応が完了するには2.5時間（150分）必要であることがわかった。

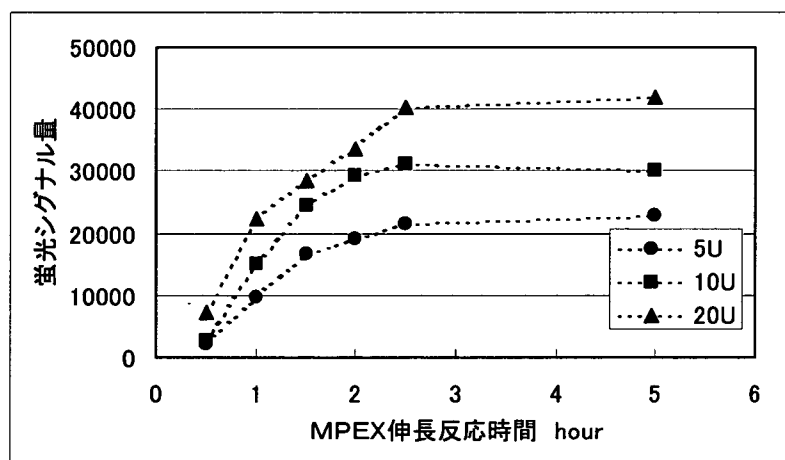


図4. 酵素量依存性

標準条件（5U）酵素量に対して、反応溶液中に添加する酵素量（ユニット数）を増やした場合のMPEX反応性を調べた。その結果、酵素量を増やすことによりシグナル検出量は増加するが、反応が完了する時間はほとんど変化しないことがわかった。

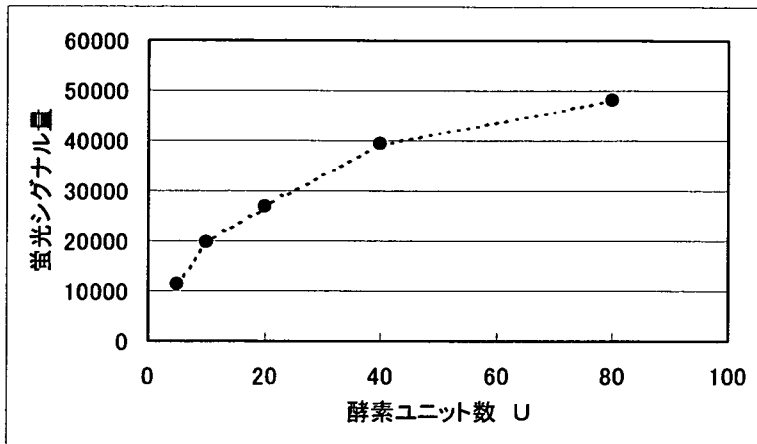


図5. 酵素量依存性

図3よりさらに酵素量を増加させて調べた。反応時間は1.5時間とした。

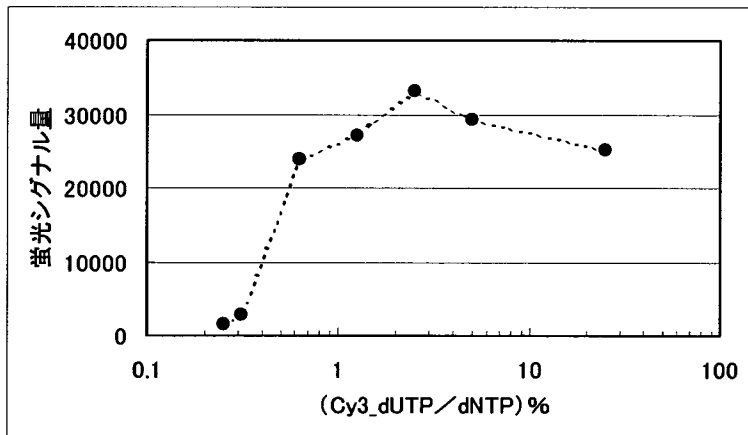


図6. ヌクレオチド量検討

標準条件 (Cy3-dUTP、dATP、dGTP、dCTPともに最終濃度は5 μ M) に対して、dATP、dGTP、dCTPの量を増加させて検討した。Cy3-dUTP濃度は固定した。

その結果、dATP、dGTP、dCTPを30倍まで過剰に添加しても蛍光シグナル量は変化しなかったが、それ以上添加すると阻害効果が確認された。

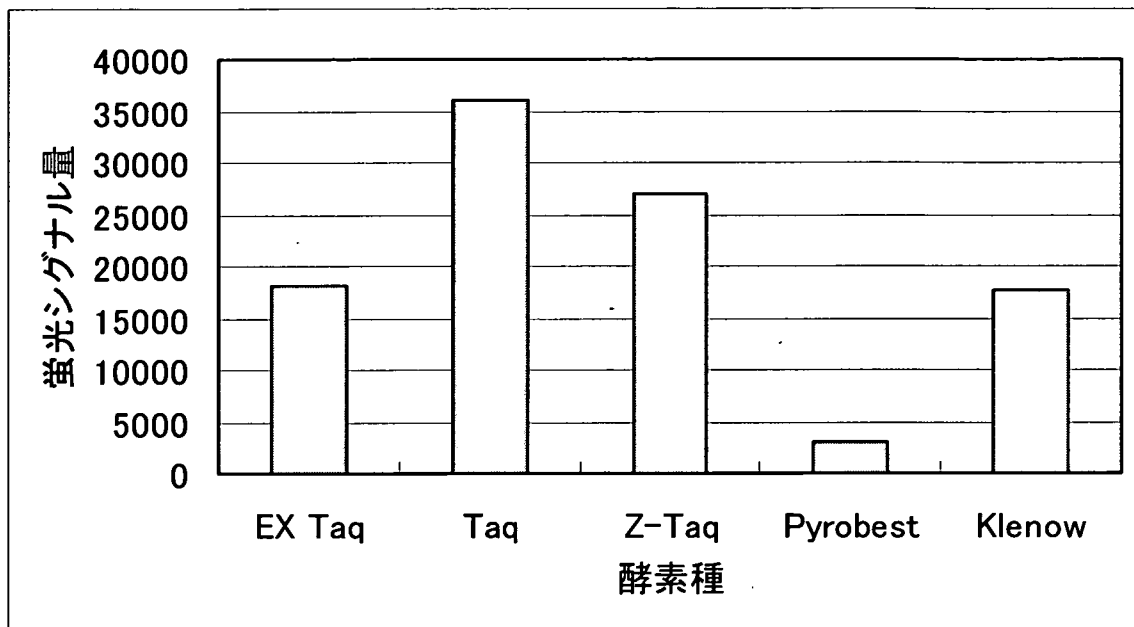


図7. 酵素種類検討

MPEX伸長反応時の酵素種類を変えて検討した。その際、すべての酵素が同じユニット数となるように調製した。

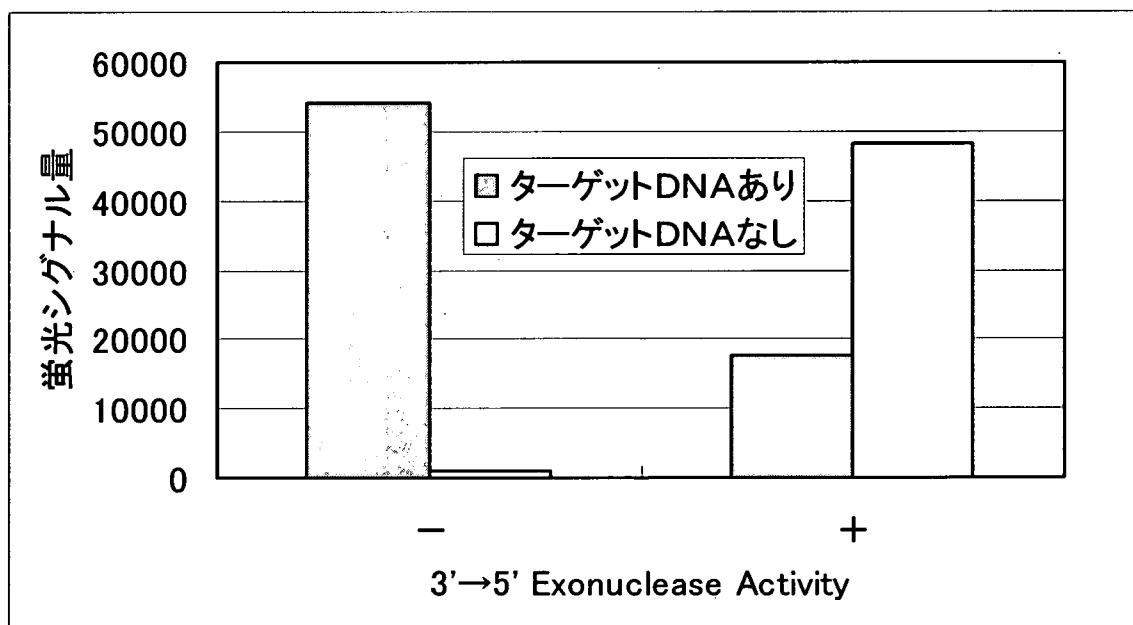


図8. 3'→5'エキソヌクラーゼ活性の影響

MPEX伸長反応時の酵素について、3'→5'エキソヌクラーゼ活性有りと無しのKlenow酵素を検討した。エキソヌクラーゼ活性有りの場合には、ターゲットDNAなしでも非特異的なシグナル検出が見られた。

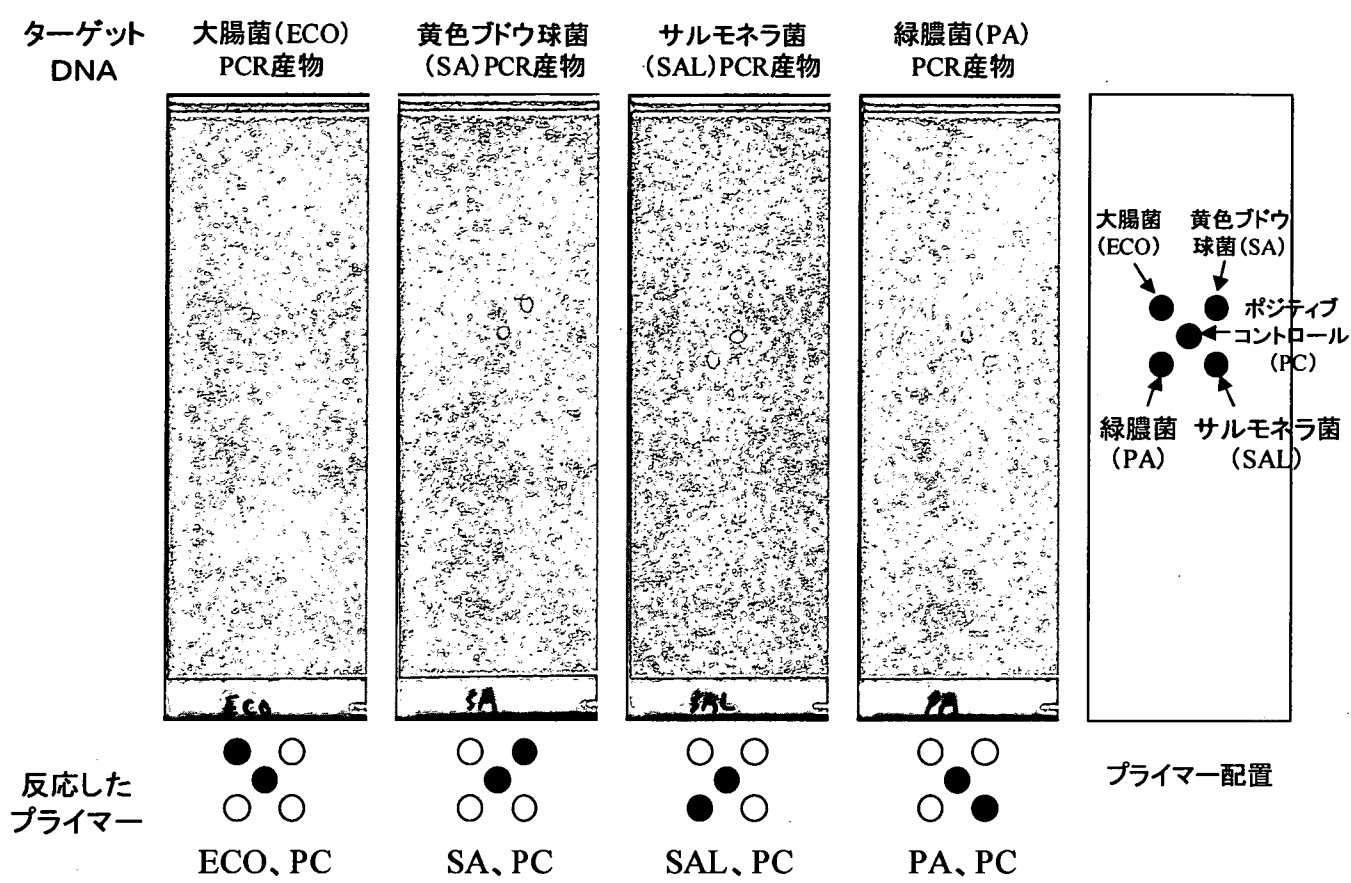


図9. 4細菌同定実験結果

基板上に4細菌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) を固定化し、4細菌23S領域で増幅したPCR産物をターゲットDNAとしてMP EX反応を行った。それぞれの基板で特異的に細菌の同定が行なえた。

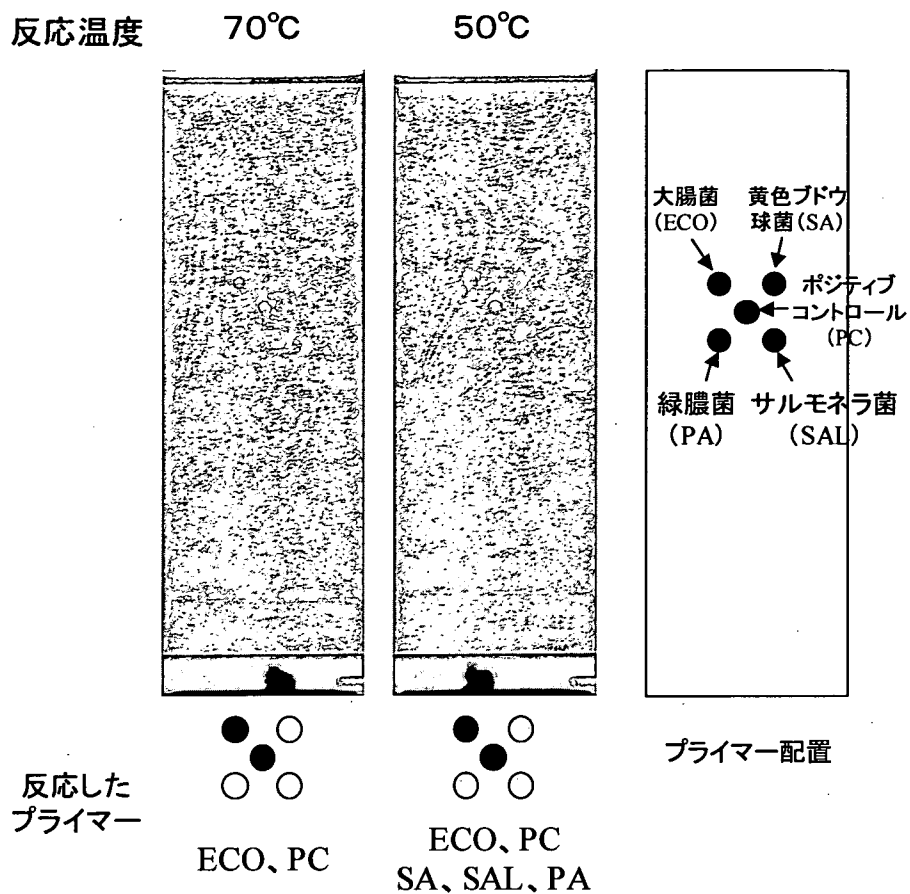


図10. MPEX伸長反応温度と特異性の関係

大腸菌PCR産物をターゲットDNAとして、反応温度70°Cと50°CそれぞれでMPEX反応を行った。

その結果、プライマーT_m温度近傍である70°Cで反応させた場合には特異性が高かったが、T_m値より20°C低い反応温度50°Cでは非特異的な反応が見られた。

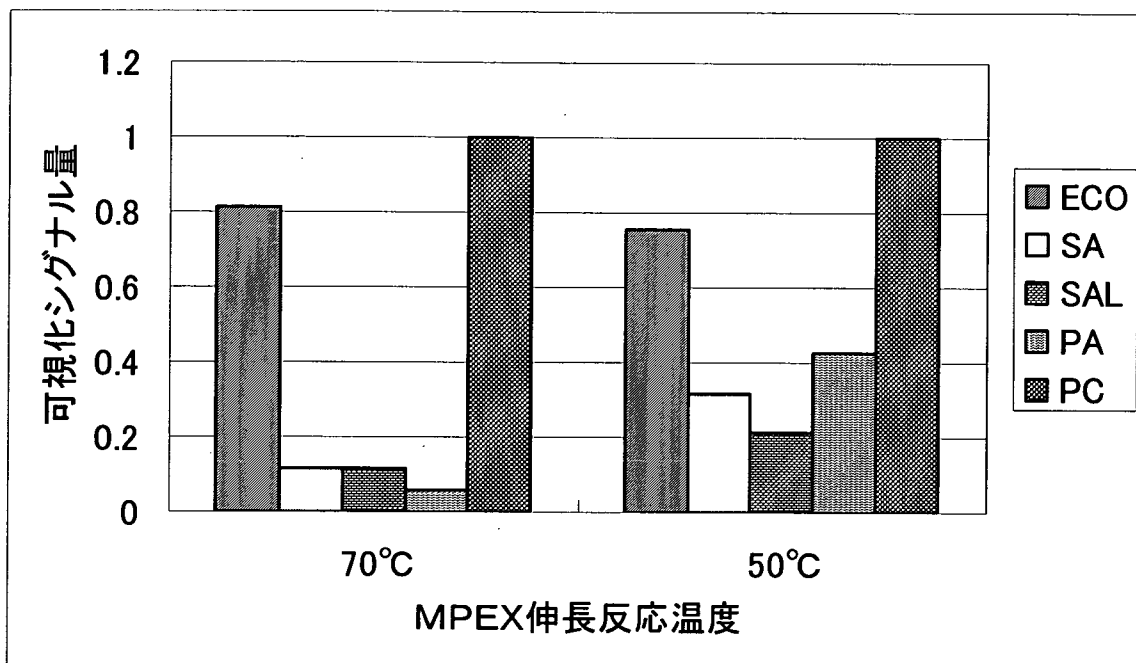


図11. MPEX伸長反応温度と特異性の関係グラフ化

図9での実験で得られた画像を「誰でもDNAアレイ解析ソフト」を用いて数値化した。この際、それぞれの画像について、ポジティブコントロールプライマー部のシグナル量を1とした相対値を算出した。

グラフの上からも、反応温度は T_m 近傍に設定することが好ましいことがわかった。

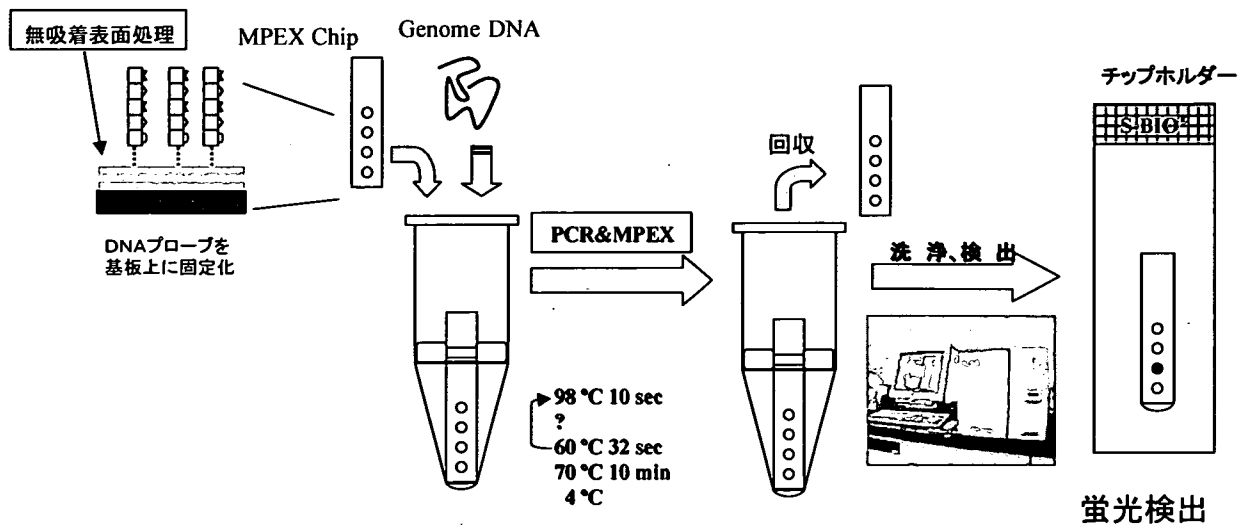


図12. ミニチップによるMPEXとPCR同時反応の操作の流れ

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。

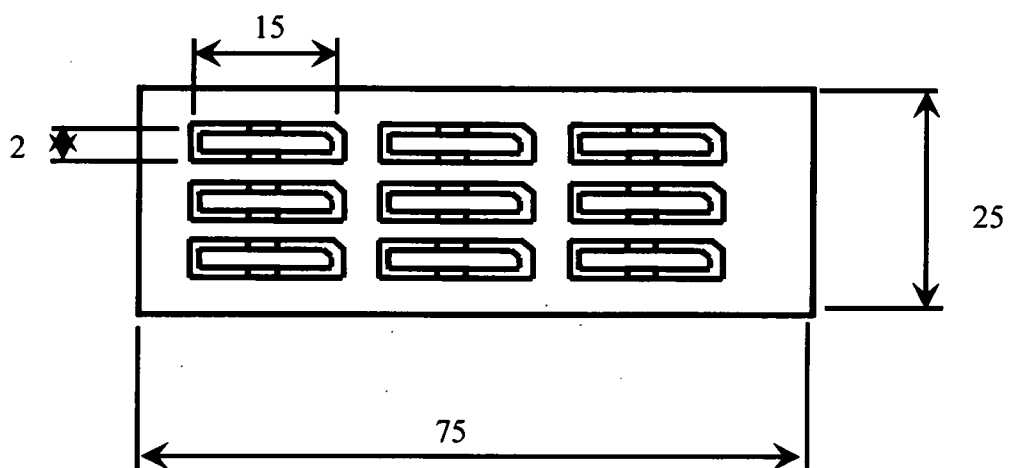


図13. ミニチップ仕様

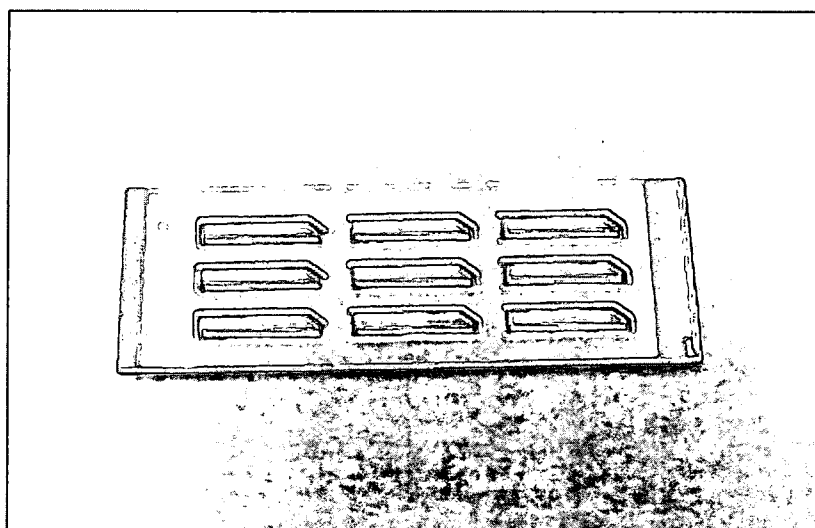


図14. 作製したミニチップ

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7.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。

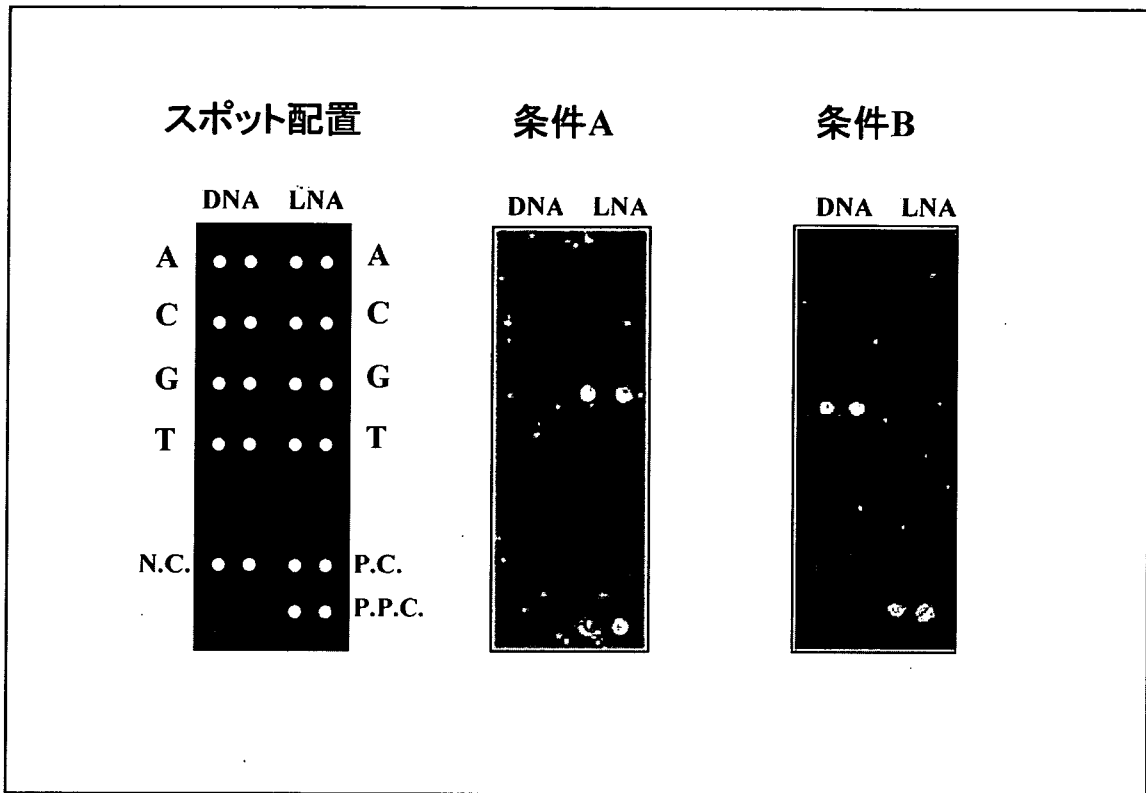


図15. PCR-MPEX同時反応法による大腸菌の検出

(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。

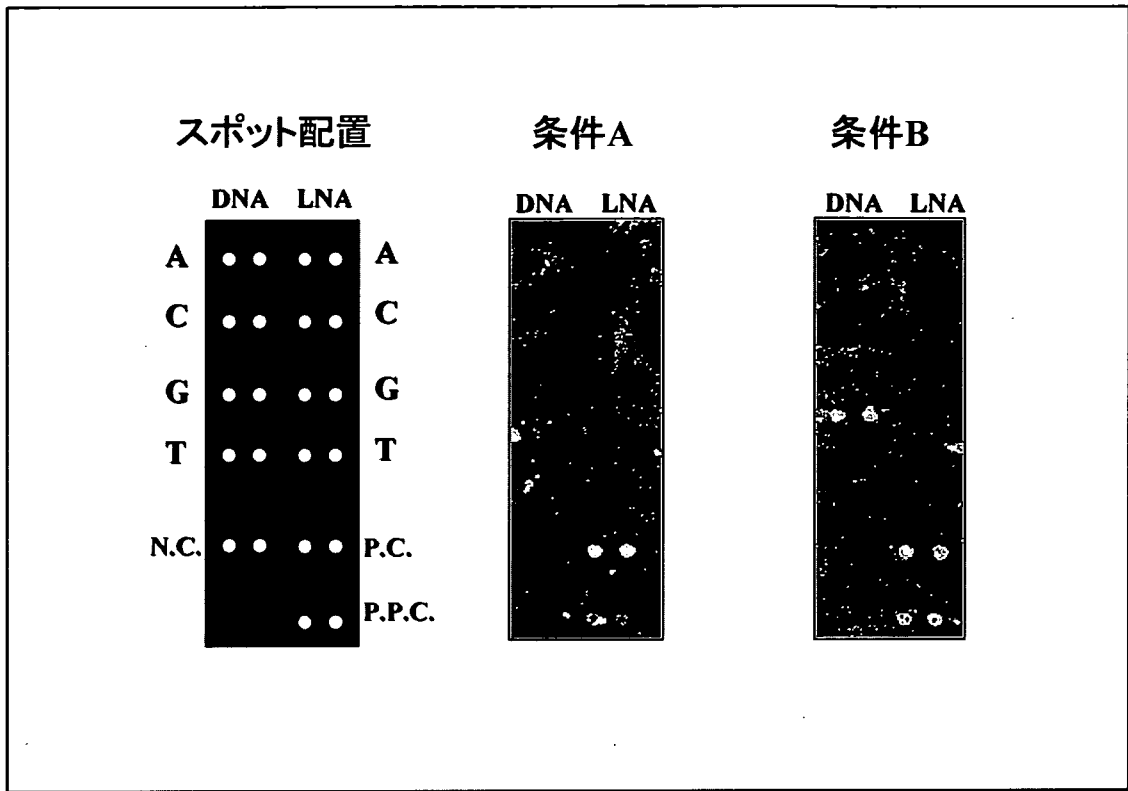


図16. PCR-MPEX同時反応法による大腸菌の検出

(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。

表8 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 -acaagaagcctgagcgccgc-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'-cctccagagtgatc gatgtt-3'

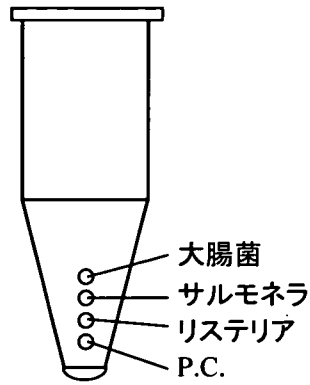
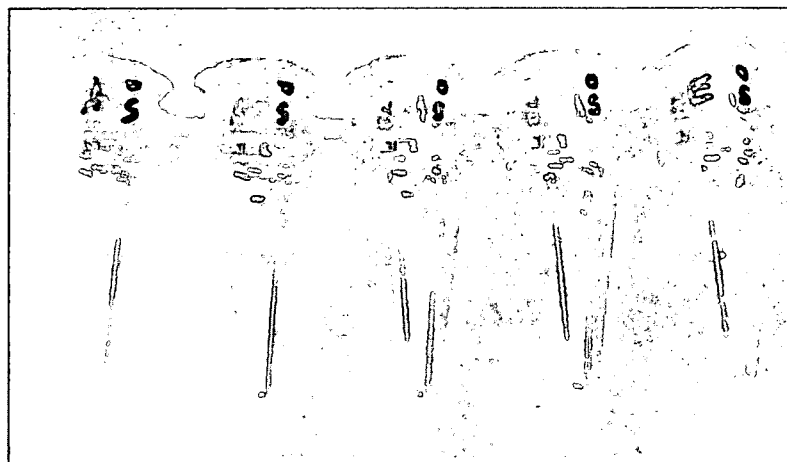


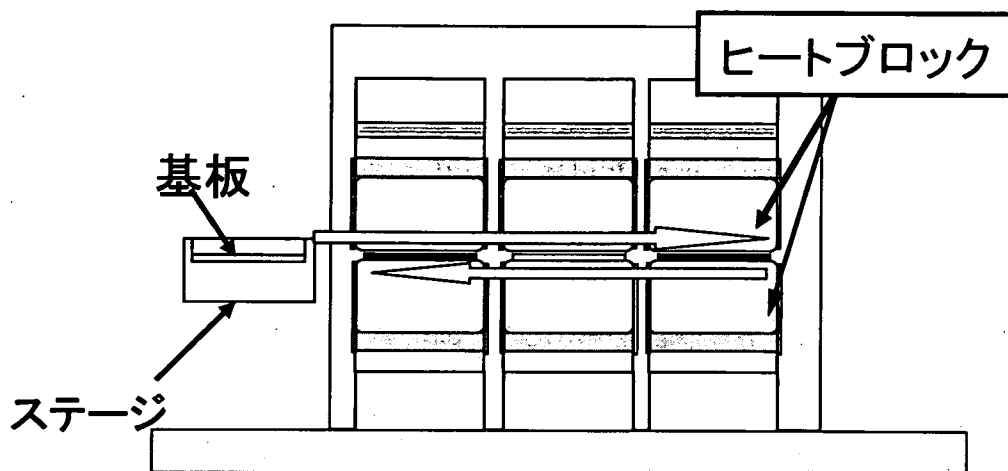
図17. PCR用チューブへのMPEXプライマーのスポット配置



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

図18. 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。



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19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。

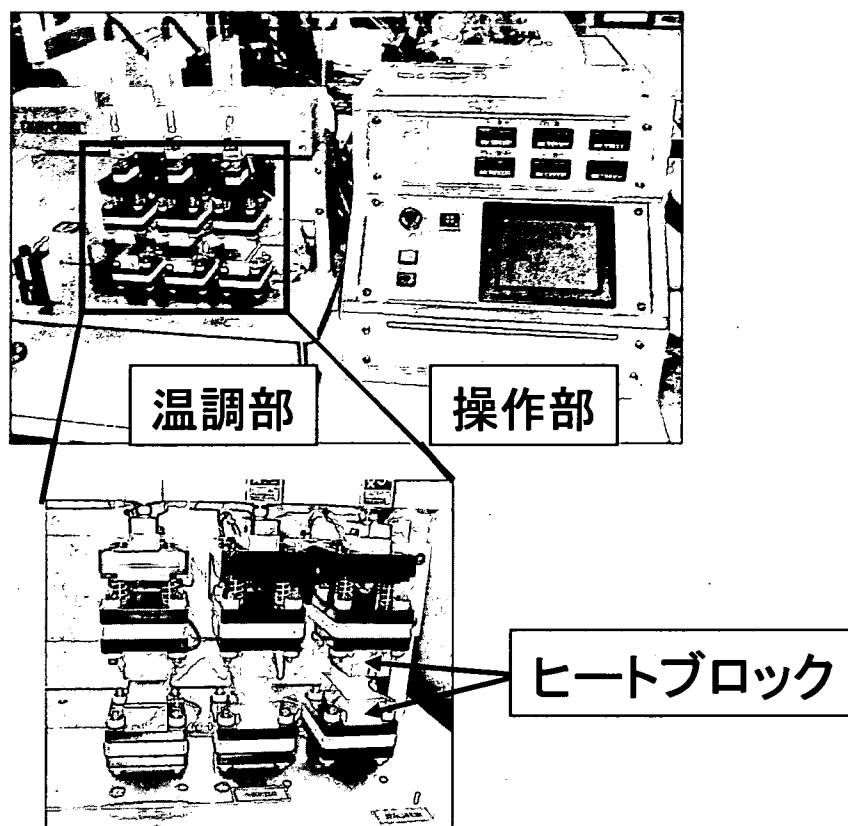


図20 基板用サーマルサイクラー試作機

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9.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

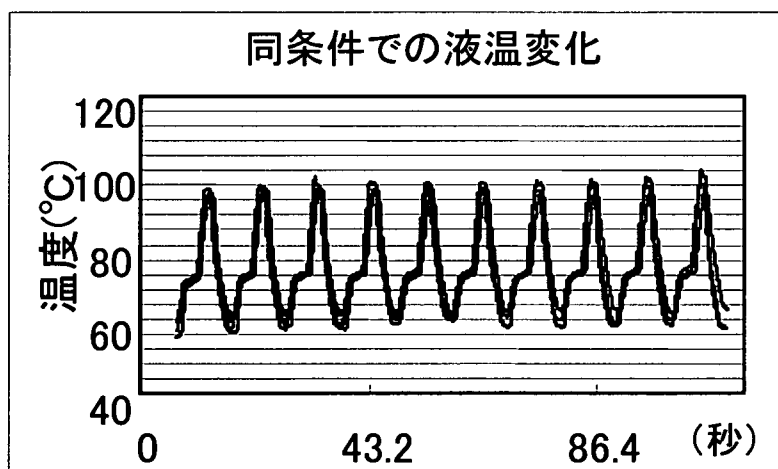
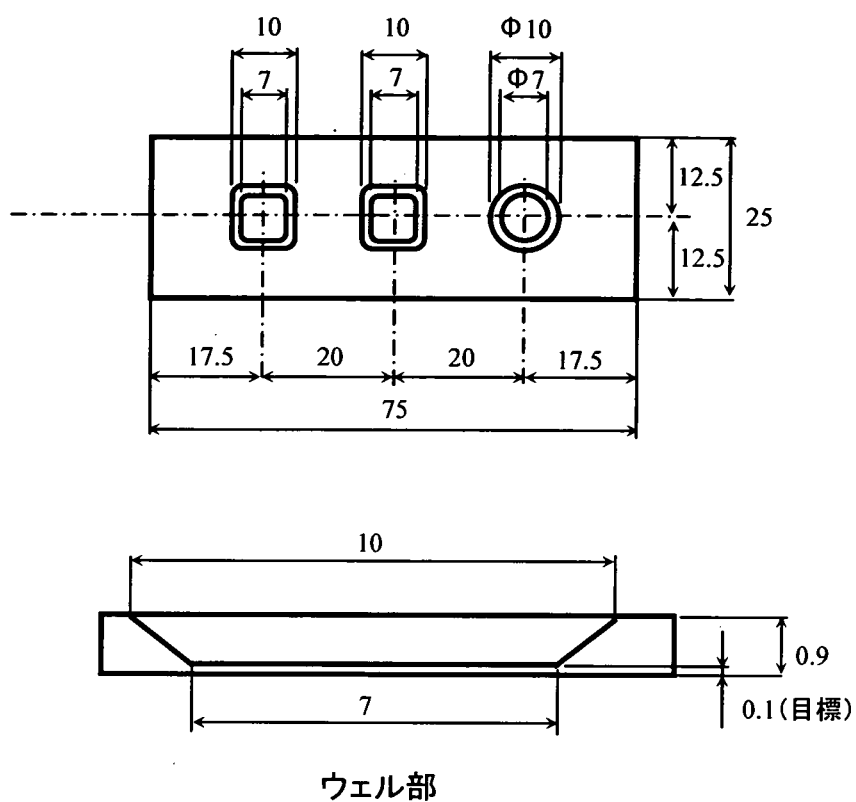


図.21 基板上の温度変化及び再現性

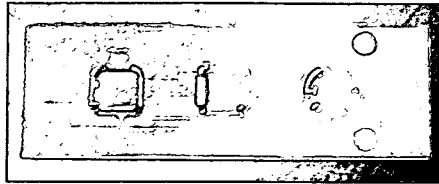
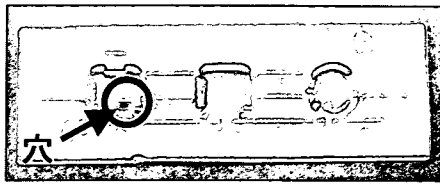
表1の条件により、1回あたり10サイクルのヒートサイクルを施した。5回のヒートサイクルを施した際の基板上の液温の変化を示す。5回とも同じ温度変化を示し、再現性が確認された。



ウェル部

図22. 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

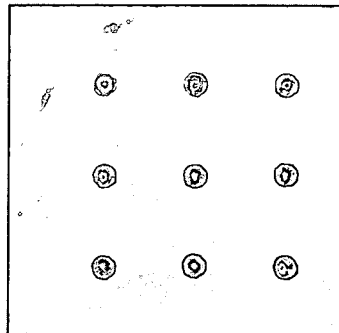
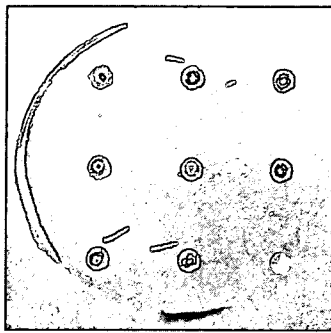
表面精度
CV:6~9%
Max-Min:40~60um

改良後

表面精度
CV:1~3%
Max-Min:10~20um

図23. 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24. 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。

表.10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	

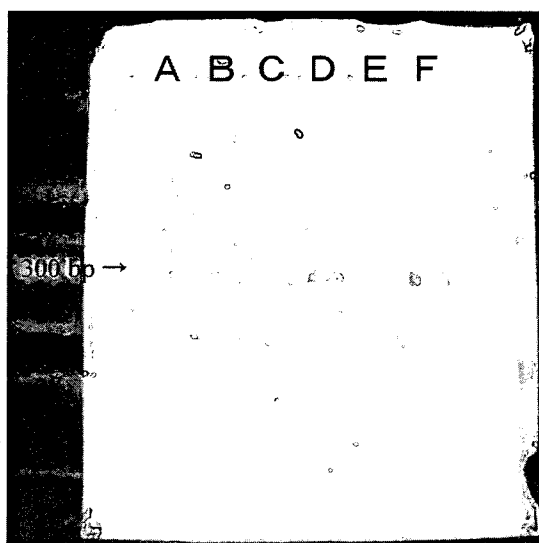


図25. ALDH2プラスミドでの電気泳動像

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)

表11 ヒートサイクル条件

	ヒートブロック		
	設定温度 (°C)	接触時間 (秒)	移動時間 (秒)
ステージ1	110	2	1
ステージ2	60	14	0
ステージ3	77	35	3

トータル
反応時間
15分

表12 PCRでの増幅結果

NO.	基板ウェルの形状	サンプル (ALDH2)	固相スポット シグナルの 強度	遺伝子の増 幅状況 (電気泳動)	気泡の 発生状況
1	円形	野生型	△	良好	多い
2	四角形	野生型	◎	良好	少ない
3	円形	野生型	○	良好	多い
4	円形	野生型	△	良好	多い
6	円形	野生型	△	良好	多い
7	四角形	変異型	◎	良好	少ない
8	円形	野生型	◎	良好	少ない

表11に示す条件にてALDH2プラスミドをサンプルとし、基板上PCR&MPEXを行い、電気泳動による増幅および固相プライマーのスポットシグナル強度の比較を行った。気泡の発生が固相スポットのシグナル強度の低下要因となることが判った。