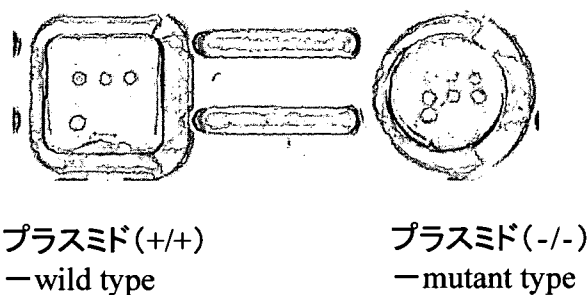


図26. ALDH2検出プライマーのスポット配置



PCRプライマー
 フォワードプライマー-CAAATTACAGGGTCAACTGCT
 リバースプライマー-CAGGTCCTGAACCTCTGGC

図27. ALDH2の検出状況

ウェル中に図10に示す配置により検出用プライマーをスポット固相化し
 上記PCR用プライマーを反応液中に添加し、ヒートサイクルを施した。
 野生型と変異型を特異的に検出することが出来ている。

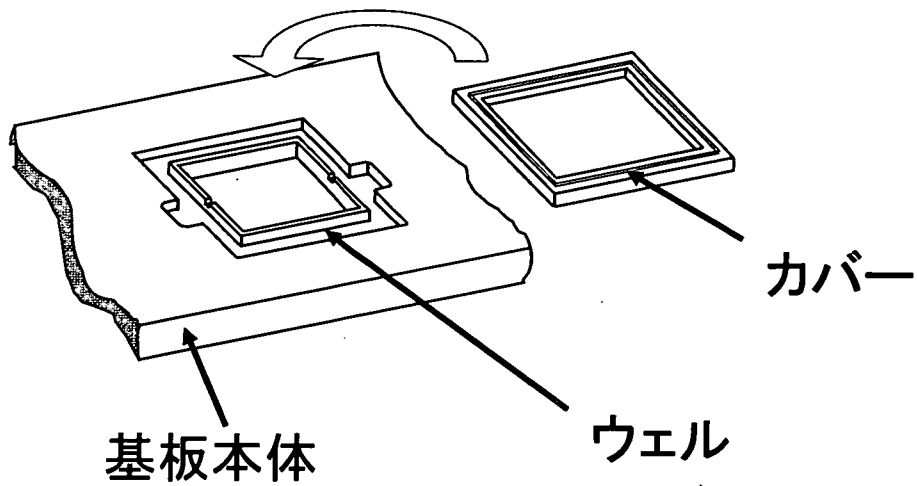


図28. カバー嵌合型基板の概要

基板本体のウェル部とカバーが嵌合する構造となっており、ウェル底面に伸長用プライマーをスポット固定後、ウェルにカバーを嵌合させシリコンゴム系接着剤により接着する。サンプル溶液は、注入口から充填される。基板上PCR&MPEX反応後、カバーは容易に外すことが可能であり、各種スキャナー等によりスポットシグナルの読み取りが可能である。

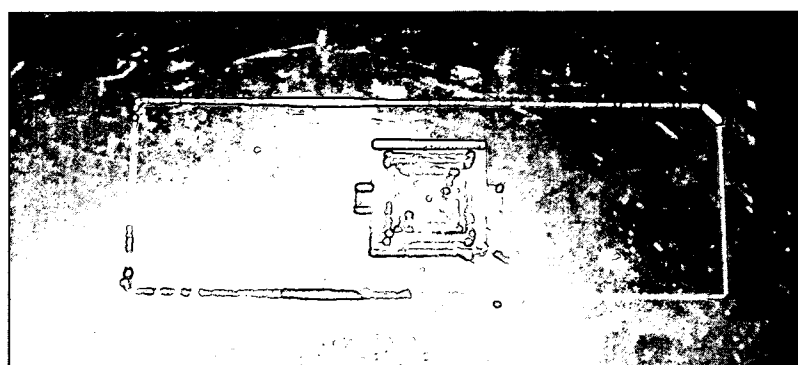
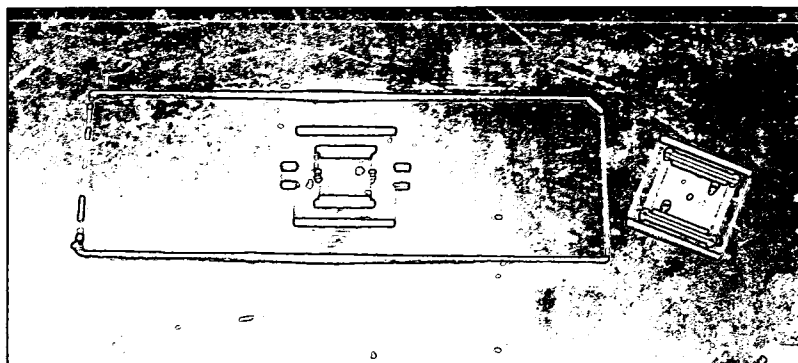


図29. カバー嵌合型試作基板

プラスチック製基板から切削加工により、カバー嵌合型基板を試作した

上: 基板本体とカバー

下: 基板本体とカバーが嵌合した状態の基板

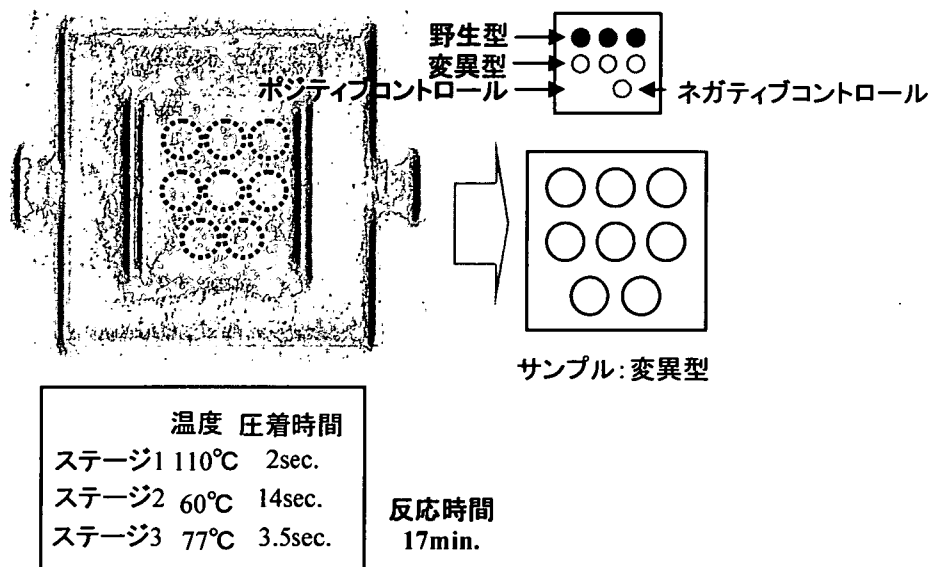


図30. カバー嵌合型基板によるALDH2 SNPの検出

ALDH2(変異型)プラスミドにより、カバー嵌合型試作基板を用い、SNPsの検出実験を実施した。検出は出来ているが、スポット強度が弱い。

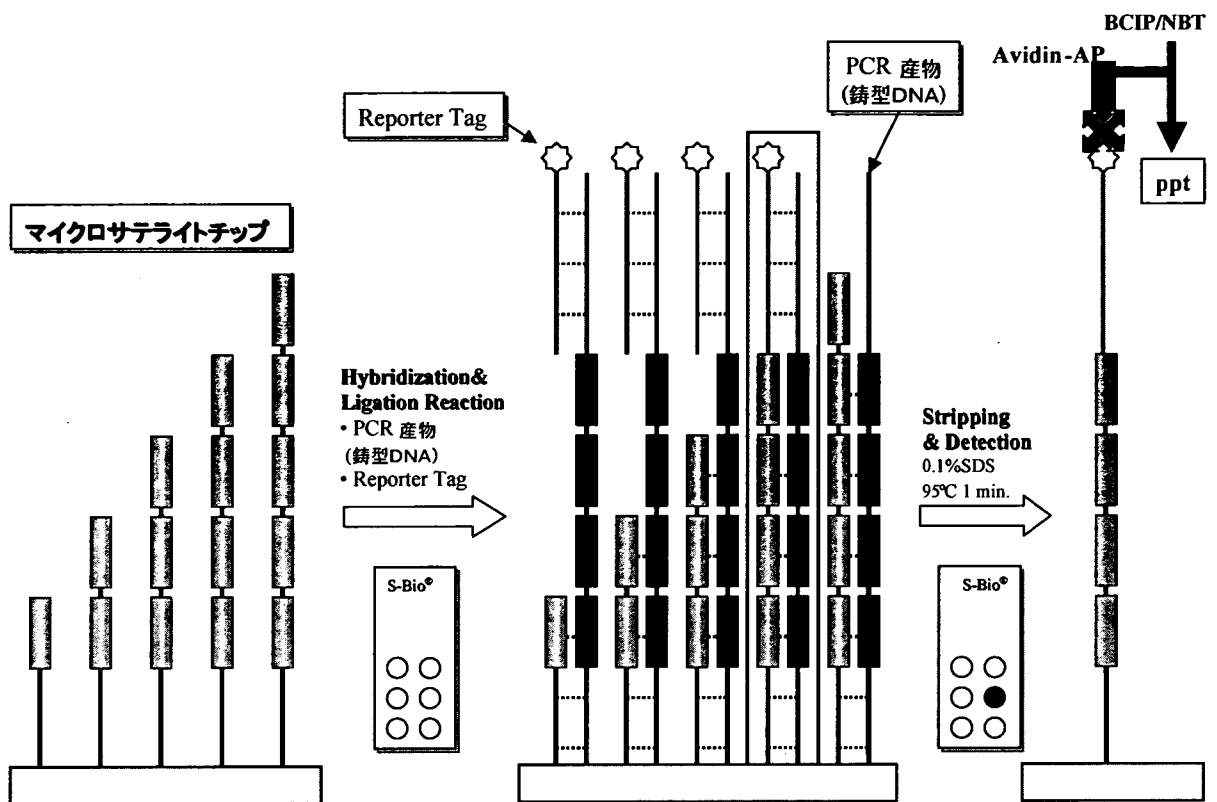


図31. MPEX法によるマイクロサテライト検出概念図

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15. 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16. マイクロサテライト検出プロトコール

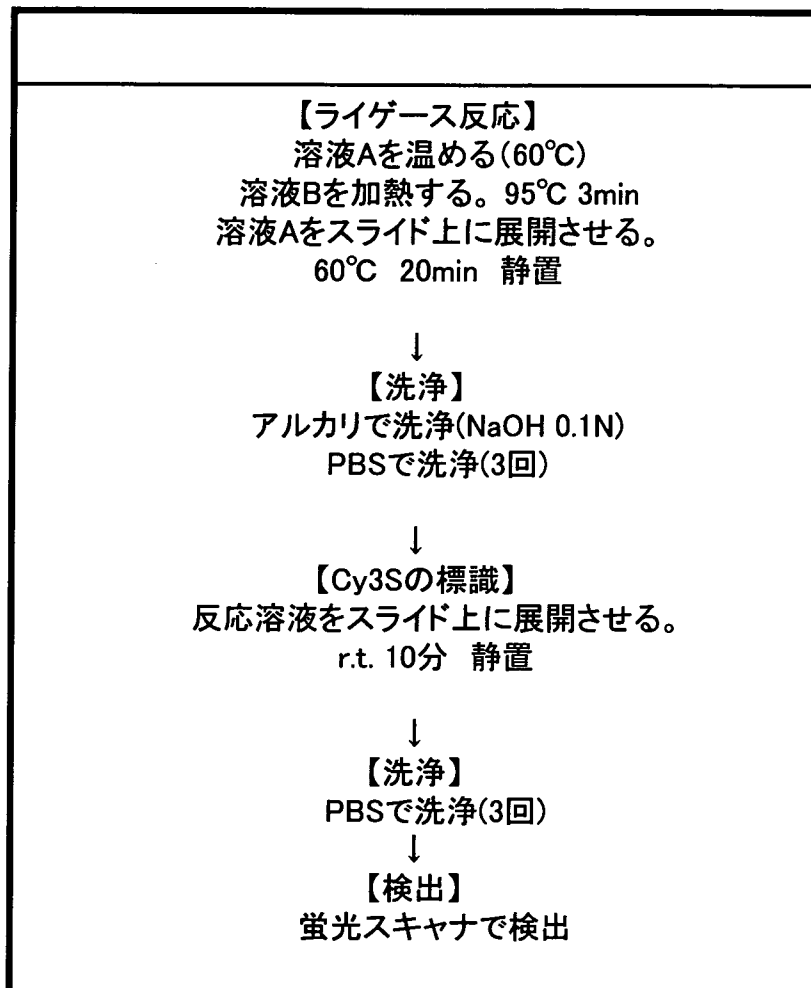


表17. マイクロサテライト検出温度管理検討のためのプロトコール

条件1	条件2
<p>【ライゲース反応】 スライドを温める(80°C) 溶液Dを加熱する。95°C 1min 反応溶液をスライド上に展開させる。 80°C 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°C) 溶液Bを加熱する。95°C 1min 溶液Bをスライド上に展開させる。 80°C 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°C) 溶液Eを加熱する。95°C 1min 溶液Eをスライド上に展開させる。 80°C 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>	

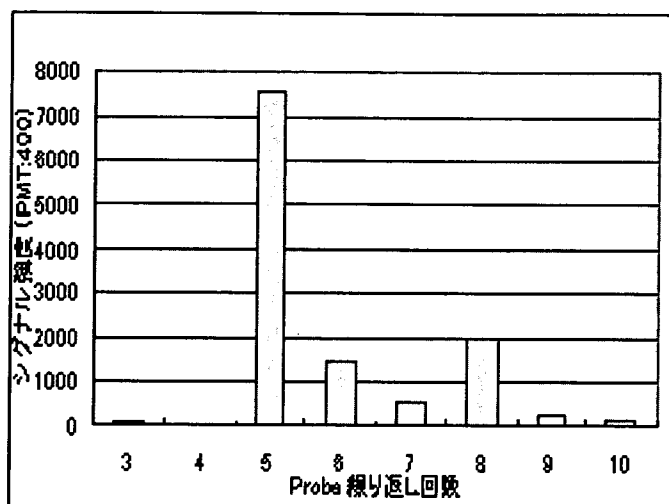


図32. 4塩基繰り返しマイクロサテライトの検出

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。

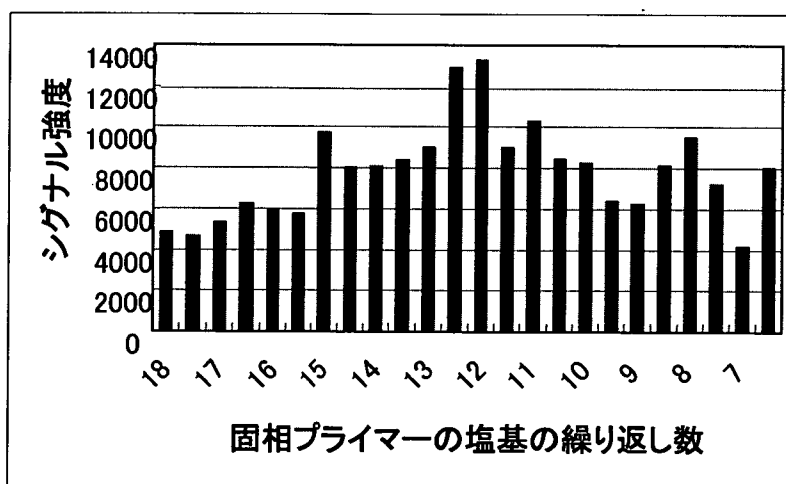


図33. 2塩基繰り返しマイクロサテライトの検出

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°C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。

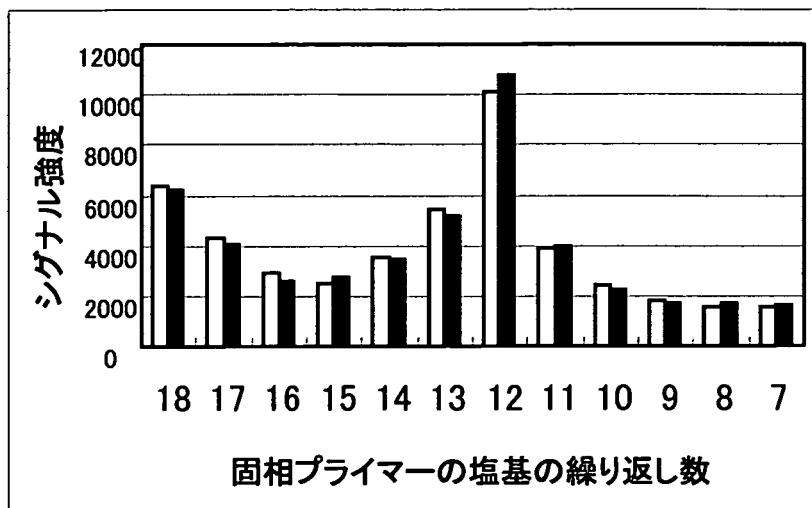


図34. 2塩基繰り返しマイクロサテライトの検出—温度管理条件1

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、耐熱性のリガーゼを用いて80℃でリガーゼ反応を行い、12回繰り返しプライマーにおいて高いシグナル強度を得た。

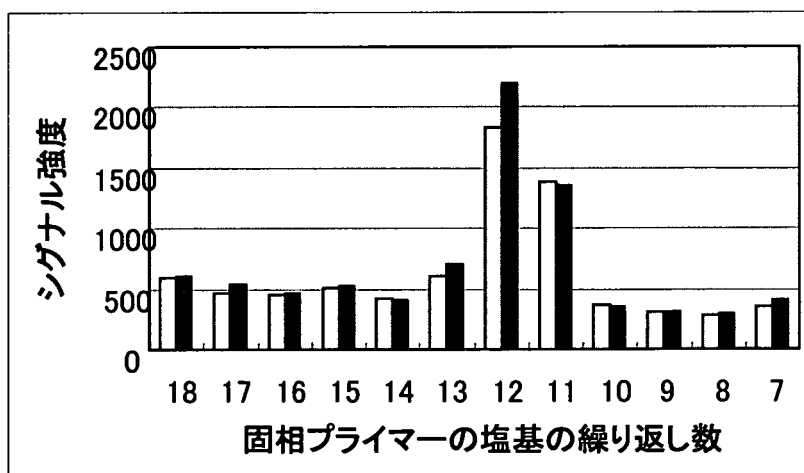


図35. 2塩基繰り返しマイクロサテライトの検出—温度管理条件2

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、耐熱性のリガーゼを用いて、ハイブリ工程とリガーゼ反応工程を分けて、80℃でリガーゼ反応を行った。12回繰り返しプライマーにおいて高いシグナル強度を得た。温度管理条件1に比較し、固相プライマーのシグナル強度分布は改善された。

表 18 関節リウマチと関連する SNP アリル (文献 Tamiya et al.より一部抜粋)

SNP allelic association						Case : Control = 940 : 940					
						Frequencies					
Cytobands	SNPs	Genes Name	Portion	Amino acid	Allele	Control	Case	P-value	Pc	Odds ratio	95% CI
6p21.3	rs2075563	TNXB	exon29+1	Glu3260Lys	G	0.106	0.162	0.00000076	0.00004	1.62	1.34-1.96
	rs185819	TNXB	exon10+	His1248Arg	A	0.647	0.711	0.000037	0.0019	1.34	1.17-1.53
	rs2269428	TNFB	exon21+	His2363Pro	A	0.107	0.159	0.000003	0.00016	1.58	1.30-1.91
	rs2071283	NOTCH4	exon4		A	0.112	0.189	0.00000000057	0.000000003	1.84	1.53-2.21
	rs2071284	NOTCH4	intron4		A	0.113	0.189	0.0000000008	0.0000000042	1.83	1.52-2.20
	rs520688	NOTCH4	exon5		G	0.326	0.408	0.0000022	0.000011	1.42	1.25-1.63
	rs415929	NOTCH4	exon4		G	0.329	0.408	0.0000055	0.000029	1.41	1.23-1.61
	rs443198	NOTCH4	exon3		T	0.504	0.569	0.000076	0.0039	1.30	1.14-1.47
	rs3219185	IKBL	promoter		G	0.929	0.964	0.000038	0.0002	2.01	1.49-2.71
	rs805273	BAT5	intron4		C	0.866	0.886	0.07	1	1.20	0.99-1.46
	rs2242656	BAT3	intron8		A	0.866	0.886	0.07	1	1.20	0.99-1.46
	rs204999	-			G	0.936	0.965	0.000042	0.0022	1.90	1.40-2.59
	rs2071798	-			T	0.713	0.768	0.00015	0.0076	1.33	1.15-1.54
	rs769178	-			A	0.186	0.227	0.0002	0.1	1.29	1.10-1.51
		HLA-DRB1			*0405	0.147	0.267	0.0000000000000000097	0.0000000000000000051	2.11	1.79-2.49

第 6 染色体上に位置し、Pc、Odds 比より相関性が高い SNP を選択した

表 19 TaqMan アッセイ法または塩基配列決定法による
 関節リウマチ感受性 SNP アリルの解析結果

DNA sample	rs2269428	rs3219185	rs204999	rs2071283	rs2071284
D001	G/T	G/G	A/A	G/A	G/A
D002	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G
D003	G/G	C/C	A/A	G/G	G/A
D004	G/T	C/G	A/G	G/A	G/A
D005	G/T	C/G	A/G	G/A	G/A
D006	G/G	C/G	A/G	G/G	G/G
D007	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G
D008	G/G	C/G	G/G	G/G	G/G
D009	G/G	C/C	G/G	G/G	G/G
D010	T/T	G/G	A/A	A/A	A/A
D011	T/T	G/G	A/A	A/A	A/A
D012	T/T	G/G	A/A	A/A	A/A
D013	G/T	G/G	A/A	G/A	G/A
D014	T/T	G/G	A/A	A/A	A/A
D015	G/T	C/G	A/A	A/A	A/A
D016	G/T	C/G	A/G	G/A	G/A
D017	G/G	C/G	A/G	G/G	G/G
D018	T/T	G/G	A/A	A/A	A/A
D019	G/G	C/G	A/G	G/G	G/G
D020	G/T	C/G	A/G	G/A	G/A
D021	G/G	C/G	A/G	G/A	G/A
D022	G/G	G/G	A/A	A/A	A/A
D023	G/T	G/G	A/A	G/A	G/A
D024	T/T	G/G	A/A	A/A	A/A

表 20 HLA-A*3303 の特異的検出

HLA-A			HLA-A				
No.	allele		検出開始時間 (分)	No.	allele		検出開始時間 (分)
01	A*2402	A*3303	39.25	19	A*0201	A*2420	No Amp.
02	A*0201	A*3303	28.5	20	A*1101	A*1101	No Amp.
03	A*2603	A*3303	34.81	21	A*0201	A*0206	No Amp.
04	A*1101	A*3303	33.47	22	A*0101	A*0201	No Amp.
05	A*3101	A*3303	30.53	23	A*1101	A*2601	No Amp.
06	A*0207	A*3303	32.21	24	A*0201	A*0201	No Amp.
07	A*2601	A*3303	29.45	25	A*0206	A*2402	No Amp.
08	A*0206	A*3303	28.65	26	A*2601	A*3101	No Amp.
09	A*2420	A*3303	30.38	27	A*3001	A*3001	No Amp.
10	A*3303	A*3303	28.14	28	A*0301	A*0301	No Amp.
11	A*3101	A*3101	No Amp.	29	A*021701	A*021701	No Amp.
12	A*2402	A*2601	No Amp.	30	A*0207	A*0201	No Amp.
13	A*2402	A*2602	No Amp.	31	A*0206	A*2604	No Amp.
14	A*2402	A*2402	No Amp.	32	A*0201	A*2601	No Amp.
15	A*1101	A*3101	No Amp.	33	A*2602	A*3101	No Amp.
16	A*0206	A*1101	No Amp.	34	A*0206	A*3101	No Amp.
17	A*0201	A*2402	No Amp.	35	A*0207	A*2402	No Amp.
18	A*2402	A*3101	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 21 HLA-B*4403 の特異的検出

HLA-B			HLA-B				
No.	allele		検出開始時間 (分)	No.	allele		検出開始時間 (分)
01	B*4403	B*5101	32.22	15	B*1501	B*4002	No Amp.
02	B*3501	B*4403	32.28	16	B*1501	B*3501	No Amp.
03	B*4403	B*4403	29.67	17	B*5101	B*5201	No Amp.
04	B*4001	B*4403	28.51	18	B*4001	B*5101	No Amp.
05	B*350101	B*440301	30.54	19	B*5101	B*5101	No Amp.
06	B*3501	B*4403	31.5	20	B*3901	B*5101	No Amp.
07	B*4403	B*5201	32.05	21	B*5502	B*5502	No Amp.
08	B*1302	B*1302	No Amp.	22	B*1501	B*3501	No Amp.
09	B*0801	B*0801	No Amp.	23	B*4006	B*5401	No Amp.
10	B*5101	B*5101	No Amp.	24	B*5502	B*5502	No Amp.
11	B*1501	B*1501	No Amp.	25	B*4006	B*5401	No Amp.
12	B*0702	B*0702	No Amp.	26	B*5102	B*5201	No Amp.
13	B*1501	B*1501	No Amp.	27	B*5101	B*5901	No Amp.
14	B*4601	B*4601	No Amp.	28	B*4002	B*5401	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 22 HLA-Cw*1403 の特異的検出

HLA-C		検出開始時間 (分)	HLA-C		検出開始時間 (分)
No.	allele		No.	allele	
01	Cw*0401 Cw*1403	33.43	16	Cw*0304 Cw*0704	No Amp.
02	Cw*0304 Cw*1403	34.39	17	Cw*0702 Cw*0702	No Amp.
03	Cw*0702 Cw*1403	30.86	18	Cw*0102 Cw*1402	No Amp.
04	Cw*0303 Cw*1403	34.46	19	Cw*0702 Cw*1502	No Amp.
05	Cw*0801 Cw*1403	31.52	20	Cw*0102 Cw*0303	No Amp.
06	Cw*1202 Cw*1403	31.52	21	Cw*0701 Cw*0701	No Amp.
07	Cw*0102 Cw*1403	41.17	22	Cw*0102 Cw*0801	No Amp.
08	Cw*1202 Cw*1403	32.7	23	Cw*0701 Cw*0701	No Amp.
09	Cw*1403 Cw*1403	32.55	24	Cw*0303 Cw*0303	No Amp.
10	Cw*1402 Cw*1403	37.58	25	Cw*0303 Cw*0801	No Amp.
11	Cw*1403 Cw*1502	38.55	26	Cw*0401 Cw*1402	No Amp.
12	Cw*0803 Cw*1403	50.34	27	Cw*0303 Cw*0702	No Amp.
13	Cw*0702 Cw*1202	No Amp.	28	Cw*0102 Cw*0401	No Amp.
14	Cw*0304 Cw*0702	No Amp.	29	Cw*0401 Cw*0702	No Amp.
15	Cw*0401 Cw*0702	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 23 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 24 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。

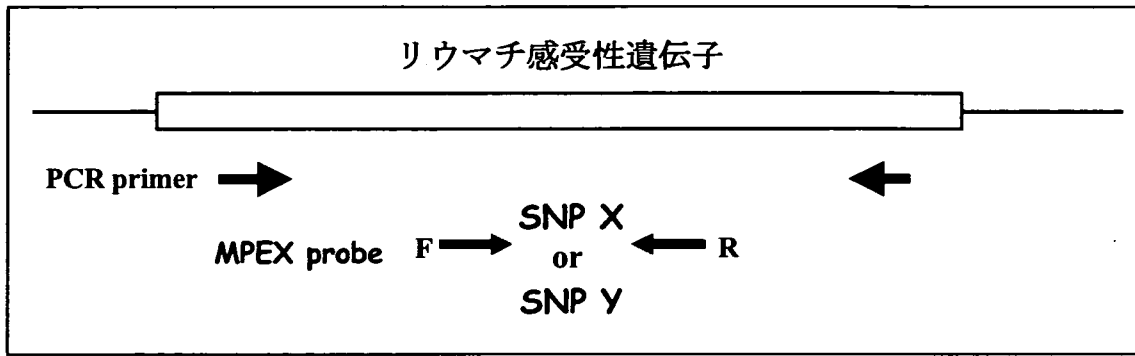


図 36 リウマチ感受性 SNPs の SNP アリル検出における PCR プライマーおよび MPEX プローブの位置

検出 SNP の位置を挟むように変異が報告されていない領域内に PCR 用プライマーを設計した。MPEX プローブは、正鎖 (F) または逆鎖 (R) の方向からそれぞれの SNP 位置が 3' 末端になるように設計した。

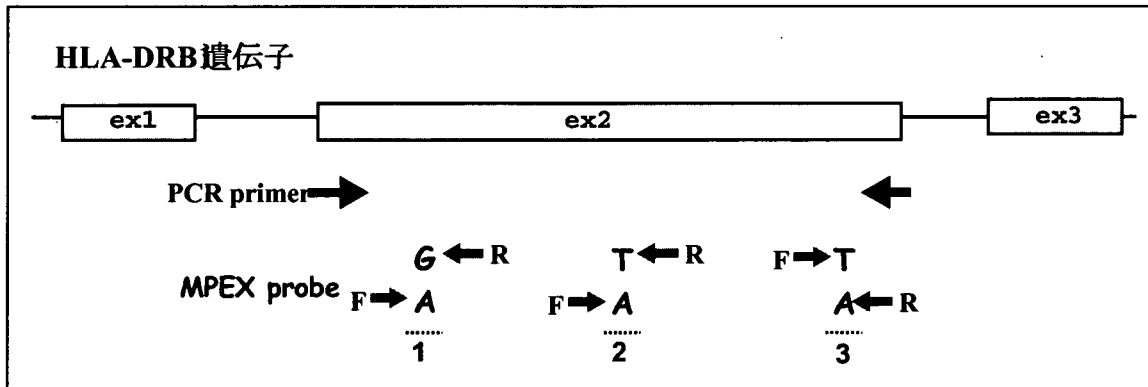


図 37 HLA-DRB1 遺伝子の多型検出における PCR プライマーおよび MPEX プローブの位置

検出する SNP の位置を挟むように変異が報告されていない領域内に PCR 用プライマーを設計した。MPEX プローブは、エクソン 2 領域内の 3 箇所の SNPs (1 [G/A], 2 [T/A], 3 [T/A]) をそれぞれ検出するように、正鎖 (F) または逆鎖 (R) の方向からそれぞれの SNP 位置が 3' 末端になるように設計した。

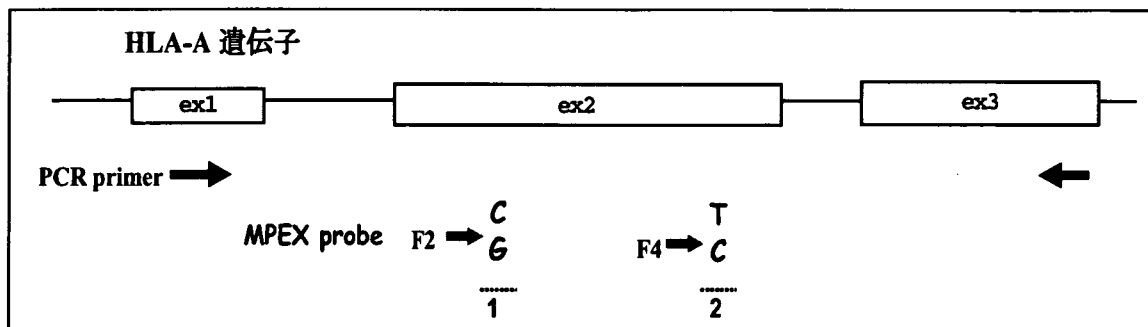


図 38 HLA-A 遺伝子の多型解析における PCR プライマーおよび MPEX プローブの位置

検出する SNP の位置を挟むようにエクソン 1 およびエクソン 3 の保存領域内に PCR 用プライマーを設計した。MPEX プローブは、エクソン 2 領域内の 2 箇所の SNPs (1 [C/G], 2 [T/C]) をそれぞれ検出するように、正鎖 (F) の方向から SNP 位置が 3' 末端になるように設計した。

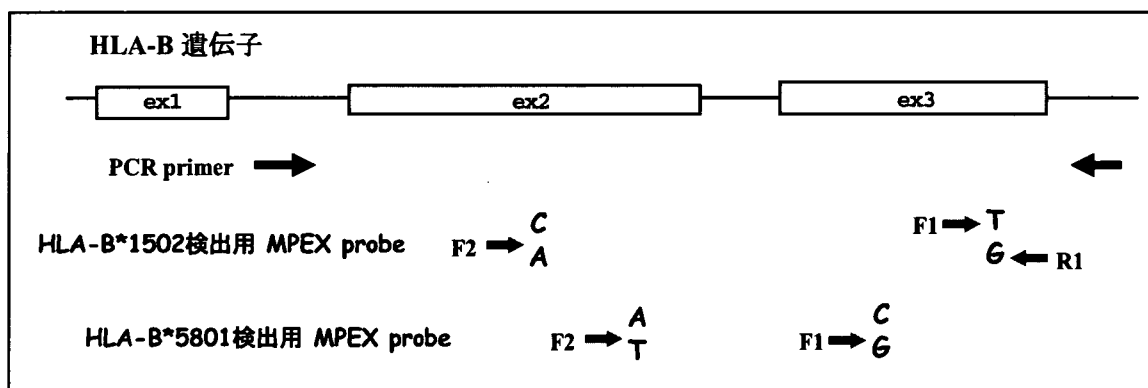


図 39 HLA-B 遺伝子の多型検出における PCR プライマーおよび

HLA-B*1502 用 MPEX プローブ、HLA-B*5801 用 MPEX プローブの位置

検出する SNP の位置を挟むようにイントロン 1 およびイントロン 3 の保存領域内に PCR 用プライマーを設計した。

HLA-B*1502 検出用 MPEX プローブは、エクソン 2 領域内の SNP (C/A) について正鎖 (F) の方向から、エクソン 3 領域内の SNP (T/G) について正鎖 (F) または逆鎖 (R) の方向から SNP 位置が 3' 末端になるように設計した。

HLA-B*5801 検出用 MPEX プローブは、エクソン 2 領域内の SNP (A/T) およびエクソン 3 領域内の SNP (C/G) について正鎖 (F) の方向から、SNP 位置が 3' 末端になるように設計した。