

図 40 LNA の構造

LNA は、リボヌクレオシドの 2' 部位の酸素原子と 4' 部位の炭素原子がメチレンを介して結合している 2 つの環状構造をもつ核酸である。

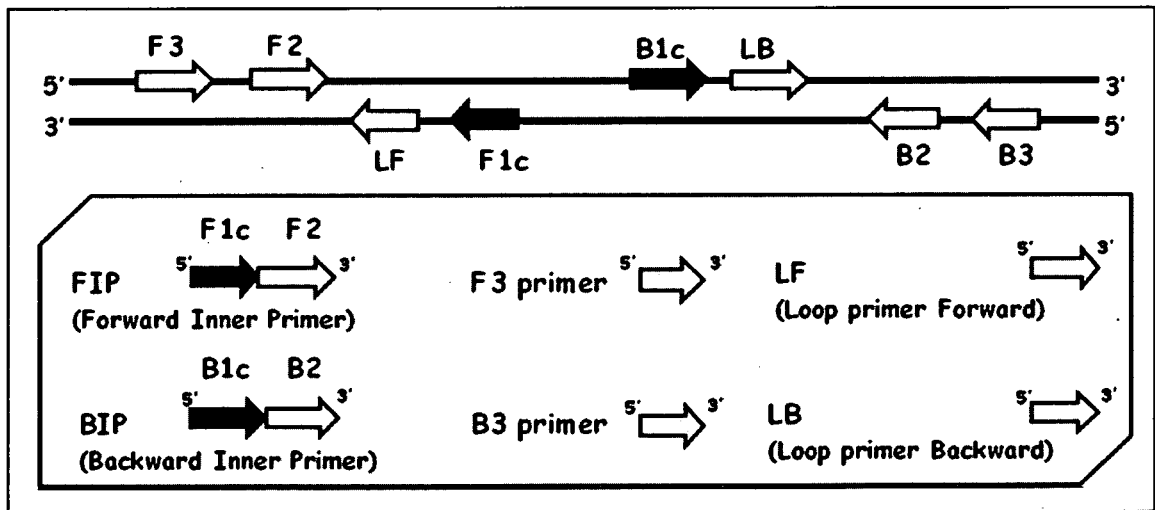


図 41 LAMP プライマーの位置

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。

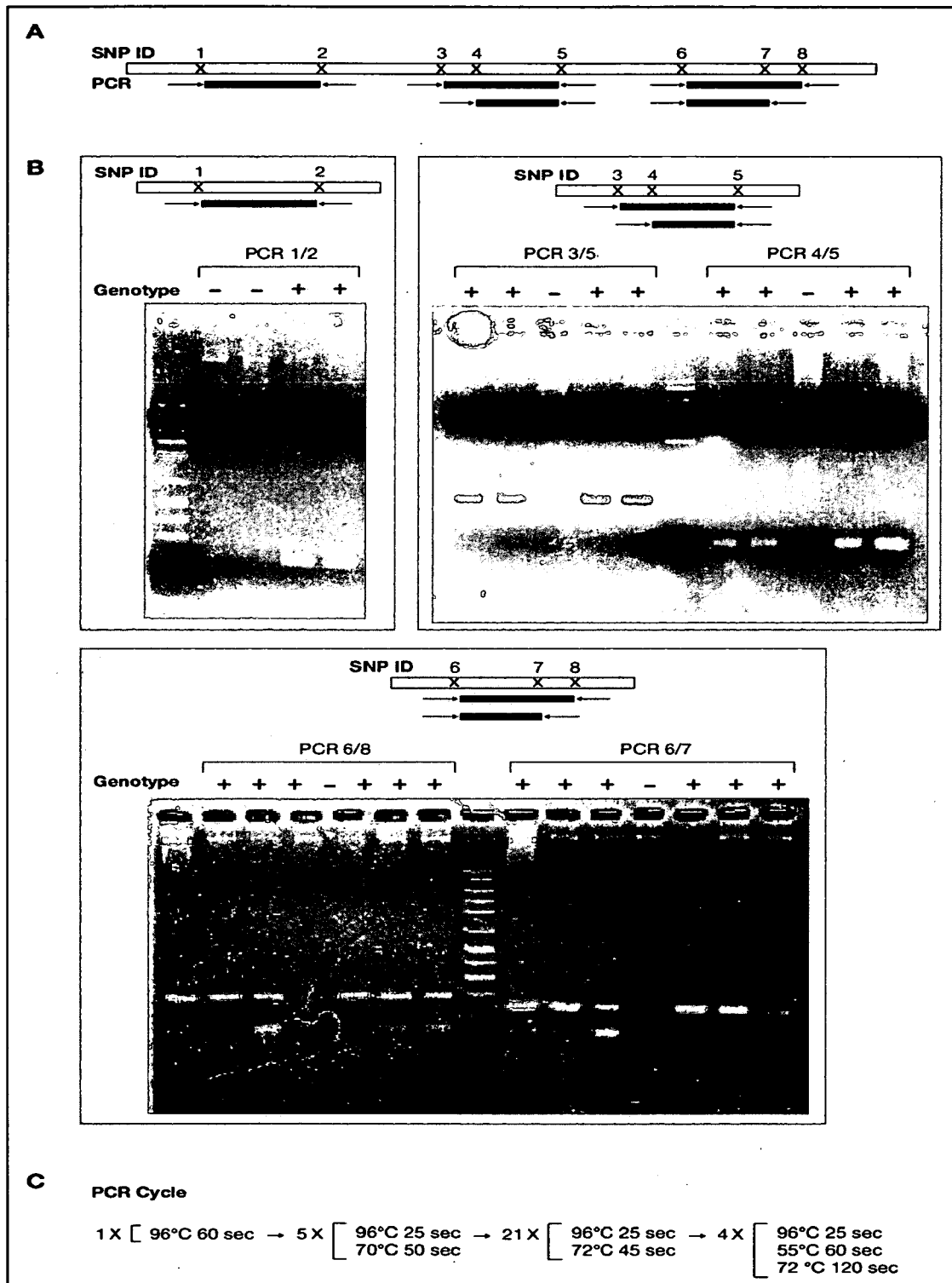


図 42 HLA 領域内の 8 個の SNP の PCR-SSP 法によるタイピング

A 図は、モデルタイピングに用いた HLA 内の 8 個の SNP の位置、PCR-SSP 法に用いたプライマーの位置、及び、PCR-SSP での予測 PCR 産物を示す。B 図は、5 種類のプライマーペアによる、精製ゲノム DNA サンプルを用いた PCR の結果の例を示す。Genotype 欄の (+) は、用いた PCR-SSP 用プライマー 3' 末端の配列がゲノム配列と一致する場合であり、(-) は一致しない場合である。PCR 反応には、AmpliTaq を用い、反応条件は C 図に示した。

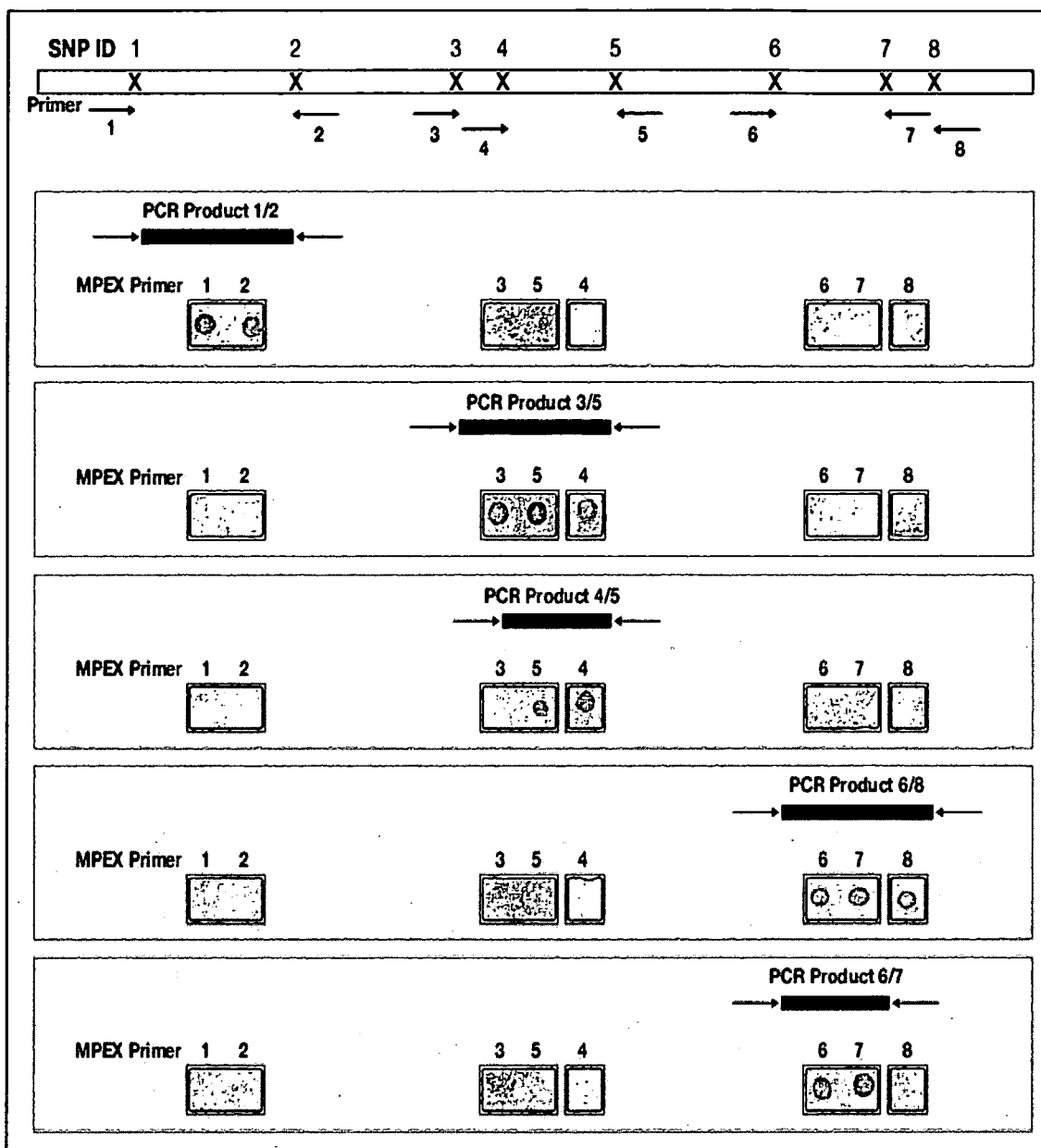


図 43 ハプロタイプ判定の為の、MPEX 反応による PCR 産物の同定

図上部より、プライマーペアー1/2、3/5、4/5、6/8、6/7 によって増幅した PCR 産物を MPEX 法によって同定した例を示した。基板上にプライマー1-8 の何れかを固定し、各 PCR 産物を用いて MPEX 反応を行った。

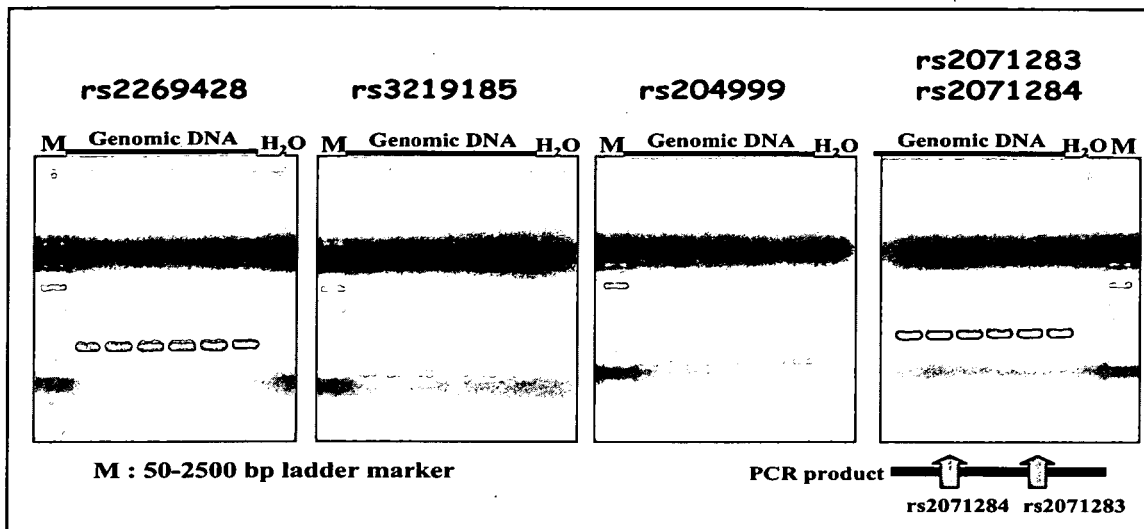


図 44 各リウマチ感受性 SNP の PCR 産物の電気泳動像

検出する 5 SNPs の内、3 SNPs (rs2269428, rs3219185, rs204999) については、それぞれ PCR 反応をおこない目的の PCR 産物 (rs2269428 : 417 bp, rs3219185 : 206 bp, rs204999 : 218 bp) を得た。近傍に位置する 2 SNPs (rs2071283, rs2071284) については、PCR 反応をおこない、2 SNPs を含んだ領域を増幅させた目的の PCR 産物 (440 bp) を得た。

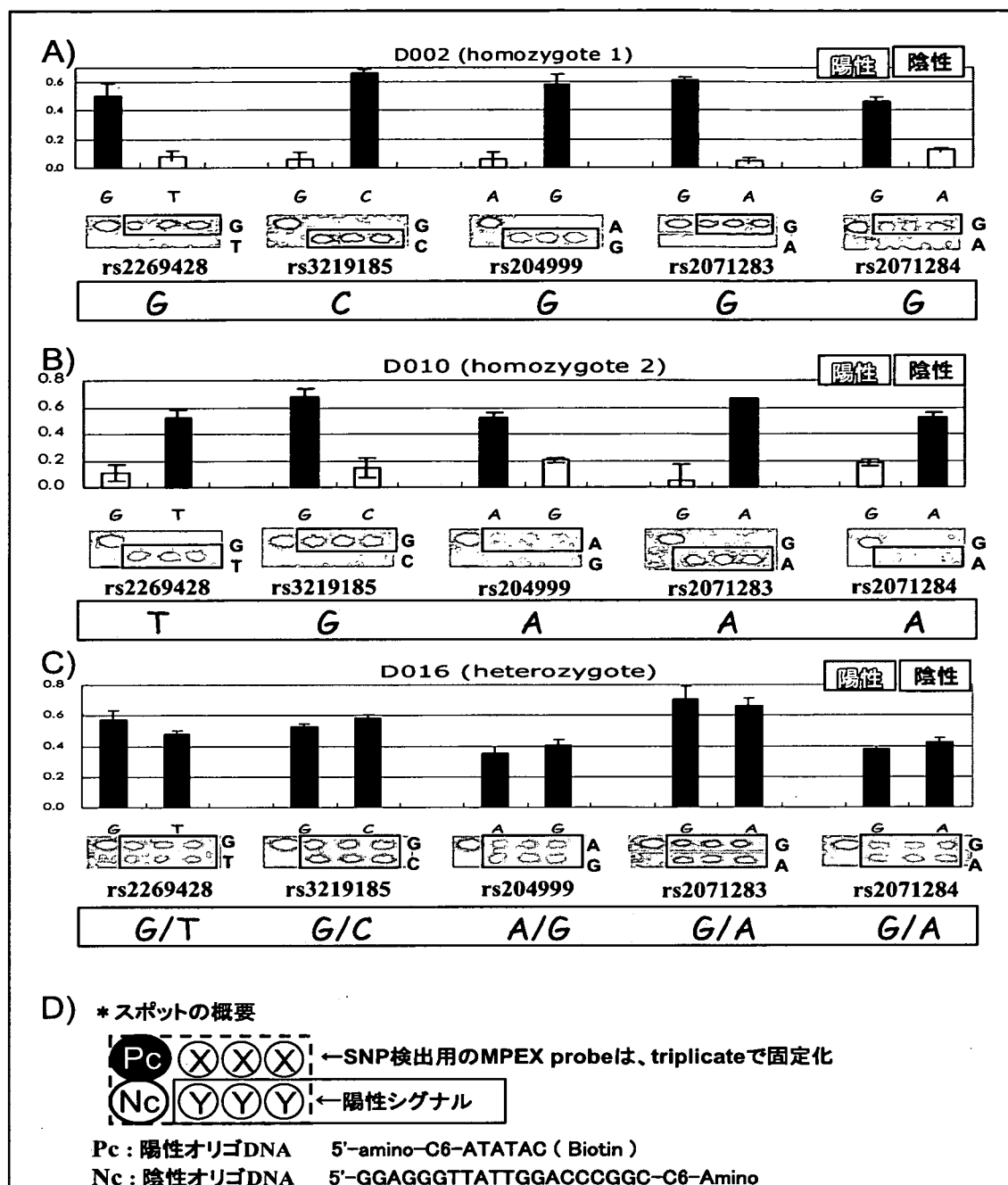


図 45 MPEX 反応によるリウマチ感受性 SNPs の SNP アリル検出におけるシグナル強度 (グラフ) およびシグナル像

上段のグラフは、5 SNPs の各アリのシグナル強度比を示している。黒色が陽性シグナル、白色が陰性シグナルである。中段には、MPEX 反応によって得られた DNA 基板上的各アリのスポットシグナル像を示している。四角枠で囲ったシグナルは、陽性シグナルである。下段の灰色枠内には、TaqMan アッセイ法または塩基配列決定法により決定した SNP アリルを示している。A) および B) は、SNP アリルがホモ型を、C) は、SNP アリルがヘテロ型である。D) は、中段のスポット像の概要を示している。

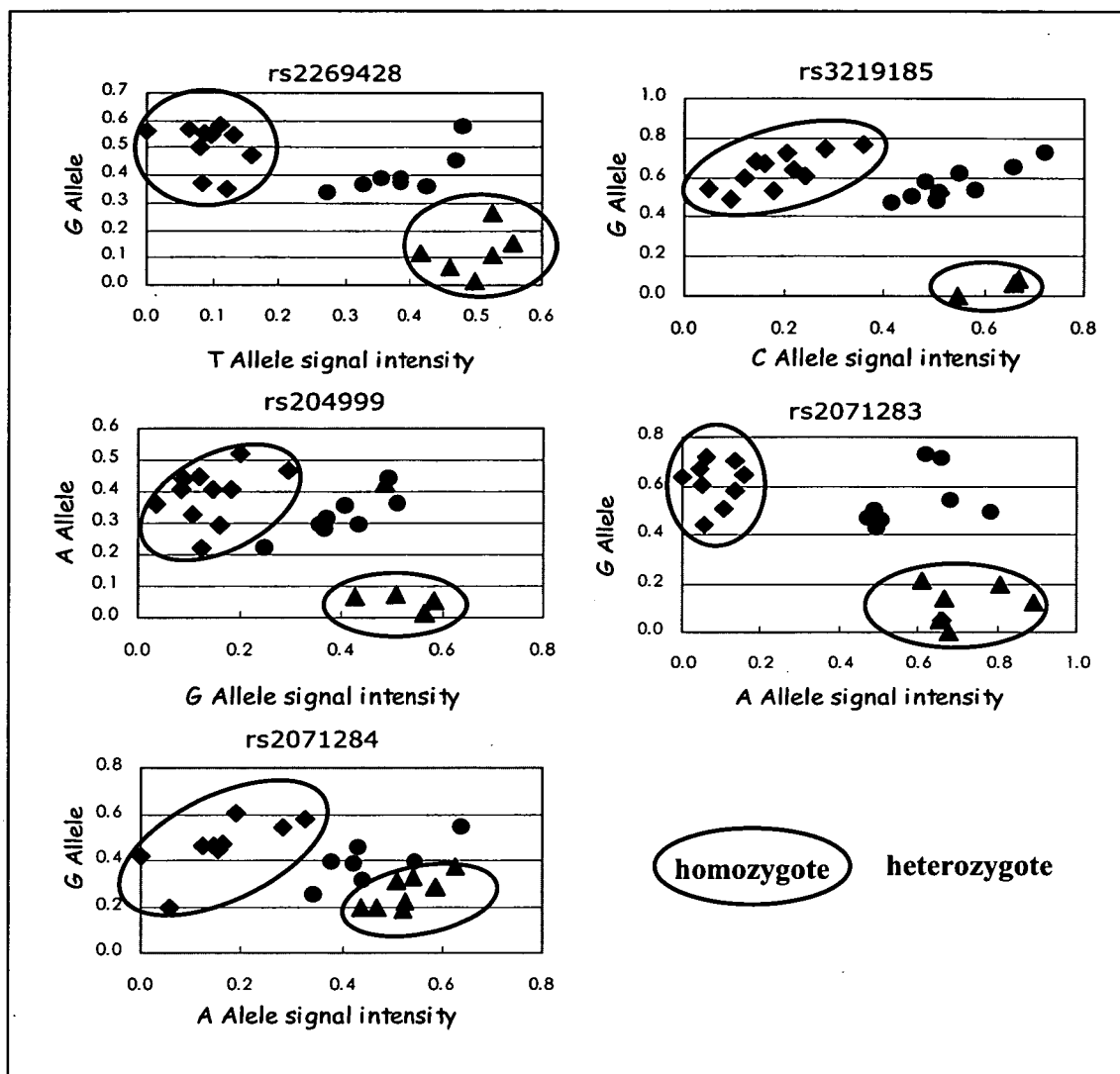


図 46 関節リウマチ感受性 SNPs の SNP アリルにおけるシグナル強度の散布図

24 サンプルについて MPEX 反応をおこない、得られた各 SNP アリルのシグナル強度を 2 次元グラフ上で 1 点として表示した散布図を作成した。それぞれの SNP に対応する 5 種類の散布図を示している。散布図において、X 軸、Y 軸にそれぞれの SNP アリルを示している。▲の点は、X 軸の SNP アリルのホモ型のサンプル、◆の点は、Y 軸の SNP アリルのホモ型のサンプル、●の点は、X 軸の SNP アリルと Y 軸の SNP アリルのヘテロ型のサンプルを表わしている。丸枠で囲った点は、各 SNP アリルのホモ型サンプルを示しており、囲まれていない点は、ヘテロ型サンプルを示している。

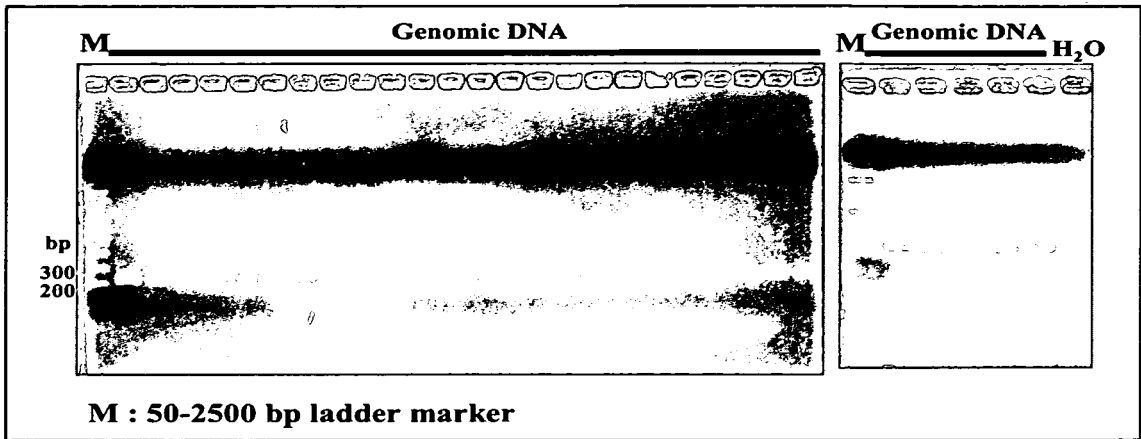


図 47 HLA-DRB1 遺伝子の PCR 産物の電気泳動像

29 サンプル全ての HLA-DRB1 アリルにおいて、目的のサイズの PCR 産物 (237 bp) が得られた。

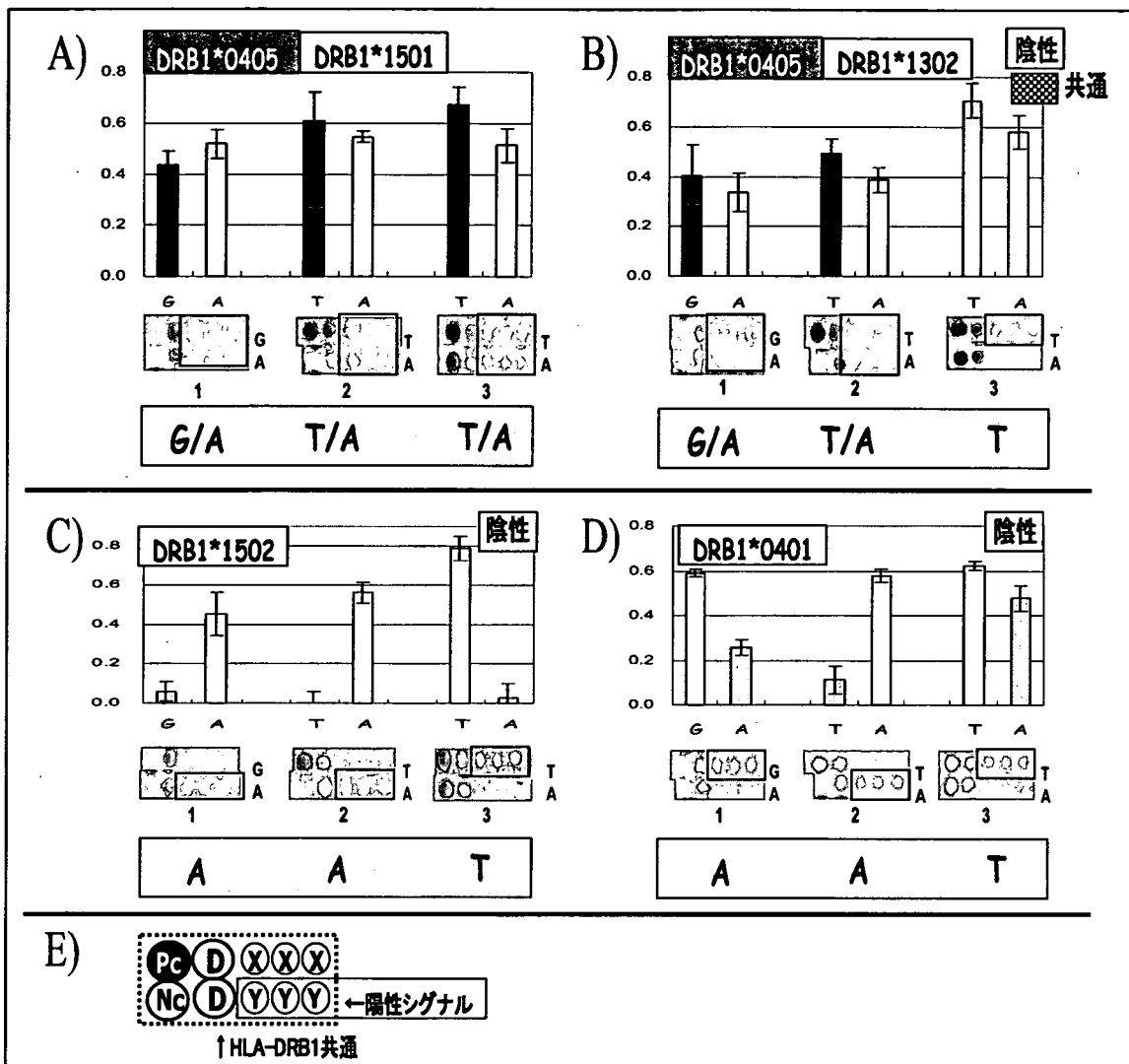


図48 MPEX反応におけるHLA-DRB1遺伝子のシグナル強度およびスポット像
 上段のグラフは、3 SNPs の各アレルのシグナル強度比を示している。A) DRB1*0405, DRB1*1501 においては、黒色が DRB1*0405 由来の陽性シグナル、白色が DRB1*1501 由来の陽性シグナルを示している。B) DRB1*0405, DRB1*1302 においては、黒色が DRB1*0405 由来の陽性シグナル、白色が DRB1*1302 由来の陽性シグナルを示している。3 の SNP (T/A) においては、両アレルとも中段には、MPEX 反応によって得られた DNA 基板上的各アレルのスポットシグナル像を示している。四角枠で囲ったシグナルは、陽性シグナルである。下段の灰色枠内には、塩基配列決定法により決定した SNP アレルを示している。A) および B) は、SNP アレルがホモ型を、C) は、SNP アレルがヘテロ型である。D) は、中段のスポット像の概要を示している。

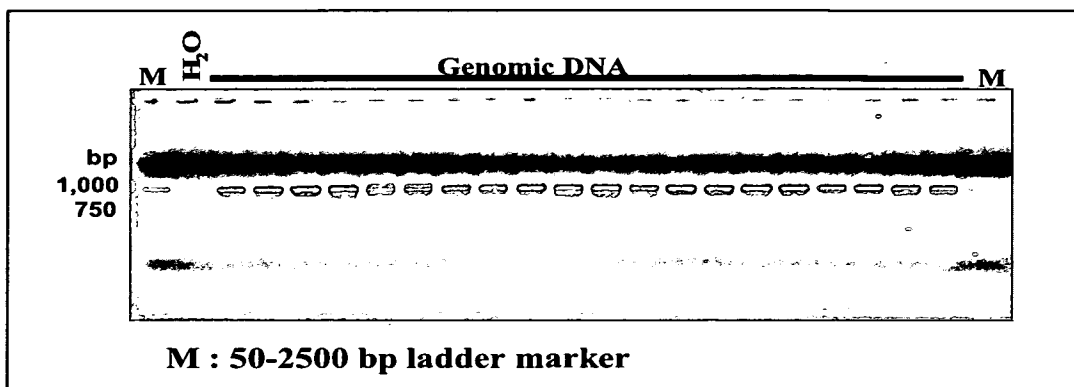


図 49 HLA-A 遺伝子の PCR 産物の電気泳動像

全てのサンプルにおいて、目的のサイズの PCR 産物 (992 bp) が得られた。

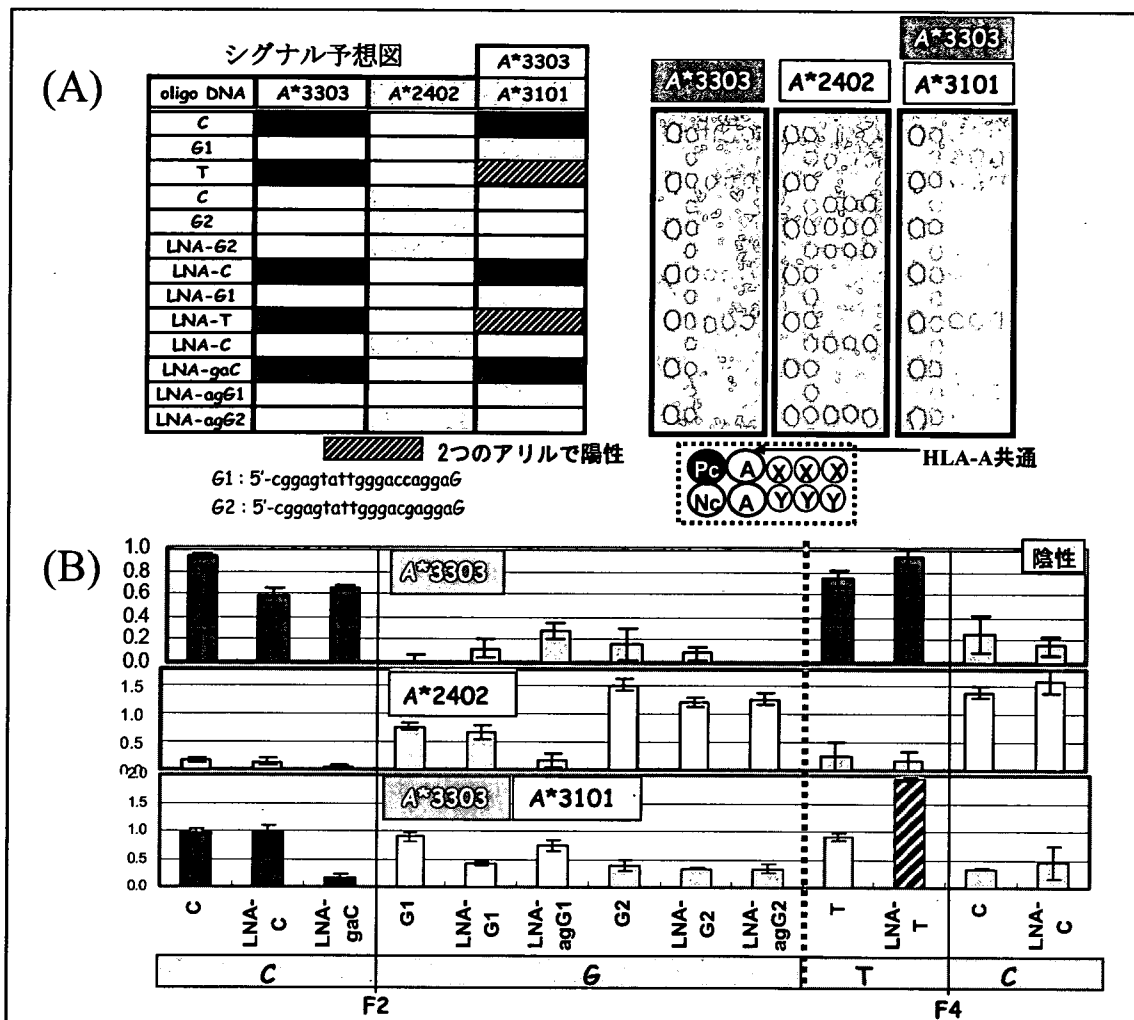


図 50 MPEX 反応における HLA-A 遺伝子の (A) スポットシグナル像、および (B) シグナル強度

(A)の左図には、各オリゴ DNA (Normal: 3'末端に何も修飾を施さない、LNA: 3'末端または 3'末端から 5 塩基内側までの SNP を全て LNA 修飾) における各 HLA-A アリルのシグナル有無の予想図を、右図には、実際のスポットシグナル像を示している。オリゴ DNA のスポットは triplicate でおこなった。シグナル予想図において A*3303 由来の陽性シグナルを黒色、A*2402 または A*3101 由来の陽性シグナルを灰色、A*3303 および A*3101 由来の陽性シグナルを黒灰色の斜線で表した。スポットシグナル像におけるオリゴ DNA の位置は、左の予想図のオリゴ DNA の位置と一致している (スポットシグナル像において、一番上段にはオリゴ DNA-C が、一番下段にはオリゴ DNA-LAN-agG2 がスポットされている)。

(B)には各オリゴ DNA のシグナル強度を示している。A*3303 由来の陽性シグナルを黒色、A*2402 または A*3101 由来の陽性シグナルを白色、A*3303 および A*3101 由来の陽性シグナルを黒白色の斜線で表した。陰性シグナルは灰色で示している。

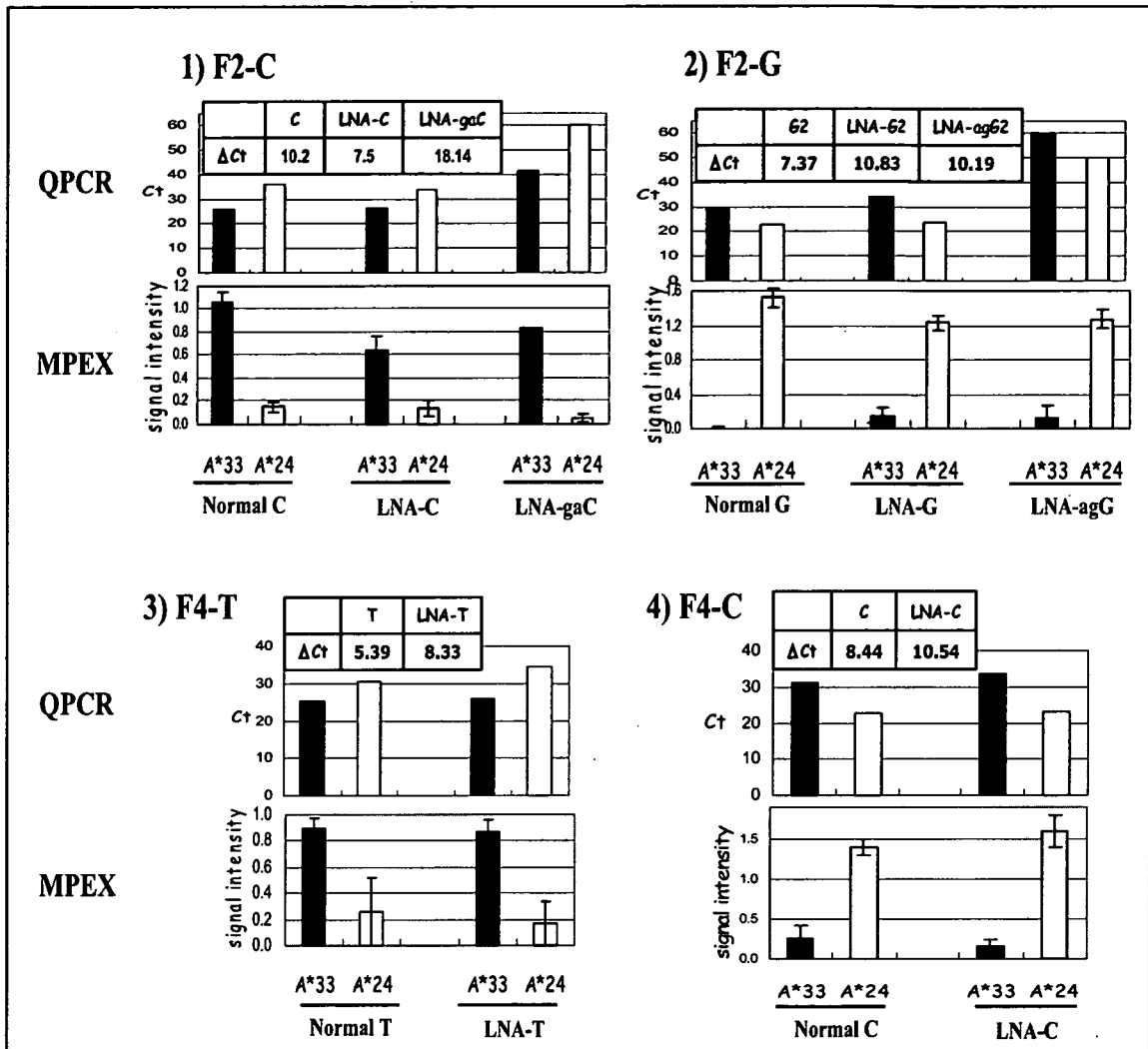


図 51 HLA-A 遺伝子の多型検出用 MPEX プローブ 3'末端修飾間のリアルタイム PCR 反応 (QPCR) の検出時間および MPEX 反応における特異性の比較

上段のグラフ (QPCR) は、縦軸にリアルタイム PCR 反応における増幅産物由来の蛍光シグナル検出開始サイクル数 (Ct)、横軸に各 HLA-A アリルの修飾オリゴ DNA (Normal: 3'末端に何も修飾を施さない、LNA: 3'末端または 3'末端から 5 塩基内側までの SNP を全て LNA 修飾) を表している。 ΔCt は、各オリゴ DNA における陽性サンプルと陰性サンプルでの蛍光シグナル検出開始サイクル数 Ct の差である。下段のグラフ (MPEX) は、縦軸に MPEX 反応において得られたスポットシグナルの強度、横軸に各 HLA-A アリルの修飾オリゴ DNA を表している。ともに、HLA-A*33 オリゴ DNA 由来の値を黒色、HLA-A*24 オリゴ DNA 由来の値を白色で示した。

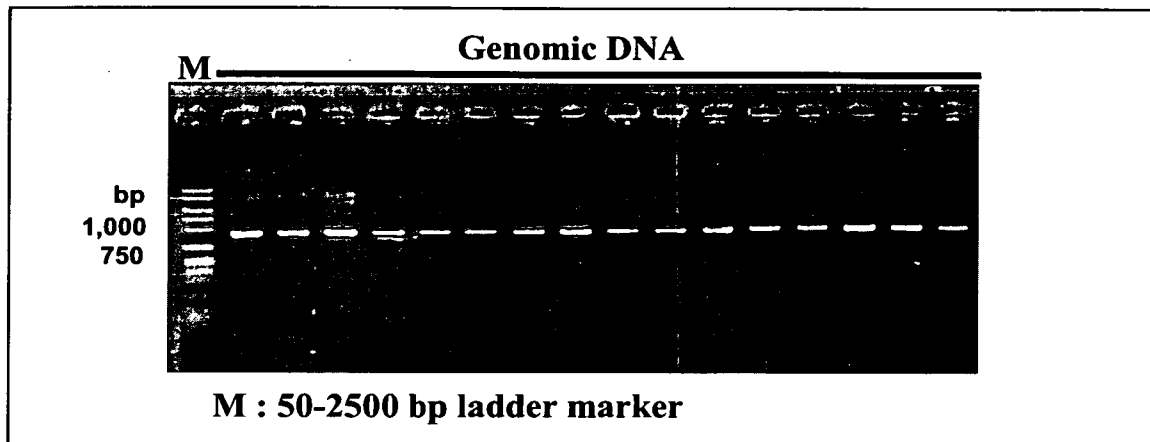


図 52 HLA-B 遺伝子の PCR 産物の電気泳動像

全てのサンプルにおいて、目的のサイズの PCR 産物 (943 bp) が得られた。

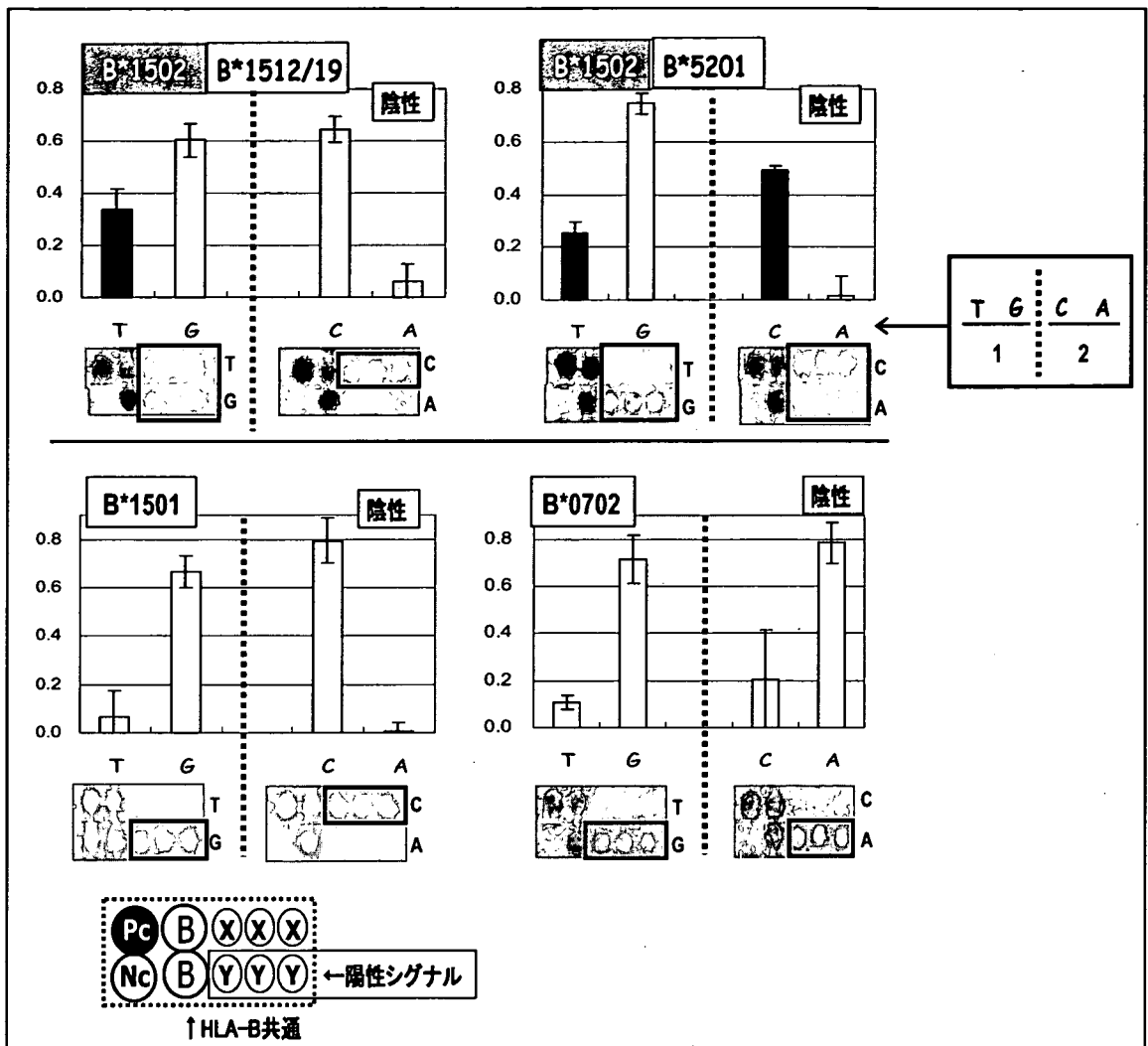


図 53 HLA-B*1502 MPEX プローブを用いた MPEX 反応における HLA-B 遺伝子多型のシグナル強度およびスポットシグナル像

上段のグラフにおいて、縦軸は MPEX 反応において得られたシグナル強度を、横軸は 3'末端に何も修飾を施していない HLA-B*1502 検出用オリゴ DNA プローブを表している。HLA-B*1502 アリル由来のシグナルを黒色、HLA-B*1512/19 または HLA-B*5201 または HLA-B*1501 または HLA-B*0702 アリル由来のシグナルを白色、HLA-B*1512/19 および HLA-B*1502 アリル由来のシグナルを黒白色の斜線で示した。また陰性シグナルを灰色で示した。

下段には、実際のスポットシグナル像を表している。オリゴ DNA のスポットは triplicate でおこなった。予想される各 HLA-B アリル由来の陽性シグナルを黒枠で示している。

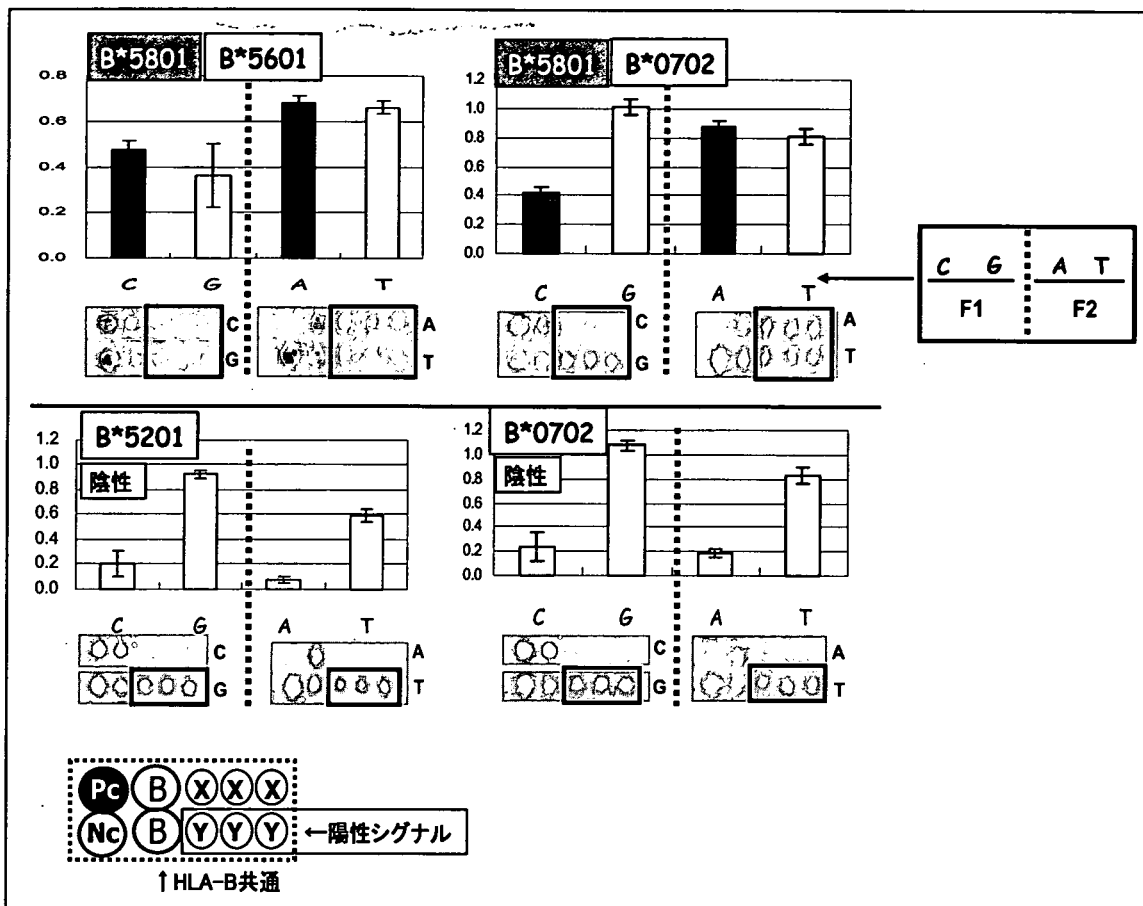


図 54 HLA-B*5801 MPEX プローブを用いた MPEX 反応における HLA-B 遺伝子多型のシグナル強度およびスポットシグナル像

上段のグラフにおいて、縦軸は MPEX 反応において得られたシグナル強度を、横軸は 3' 末端に何も修飾を施していない HLA-B*5801 検出用オリゴ DNA プローブを表している。HLA-B*5801 アリル由来のシグナルを黒色、HLA-B*5601 または HLA-B*0702 または HLA-B*5201 アリル由来のシグナルを白色、また陰性シグナルを灰色で示した。

下段には、実際のスポットシグナル像を表している。オリゴ DNA のスポットは triplicate でおこなった。予想される各 HLA-B アリル由来の陽性シグナルを黒枠で示している。

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

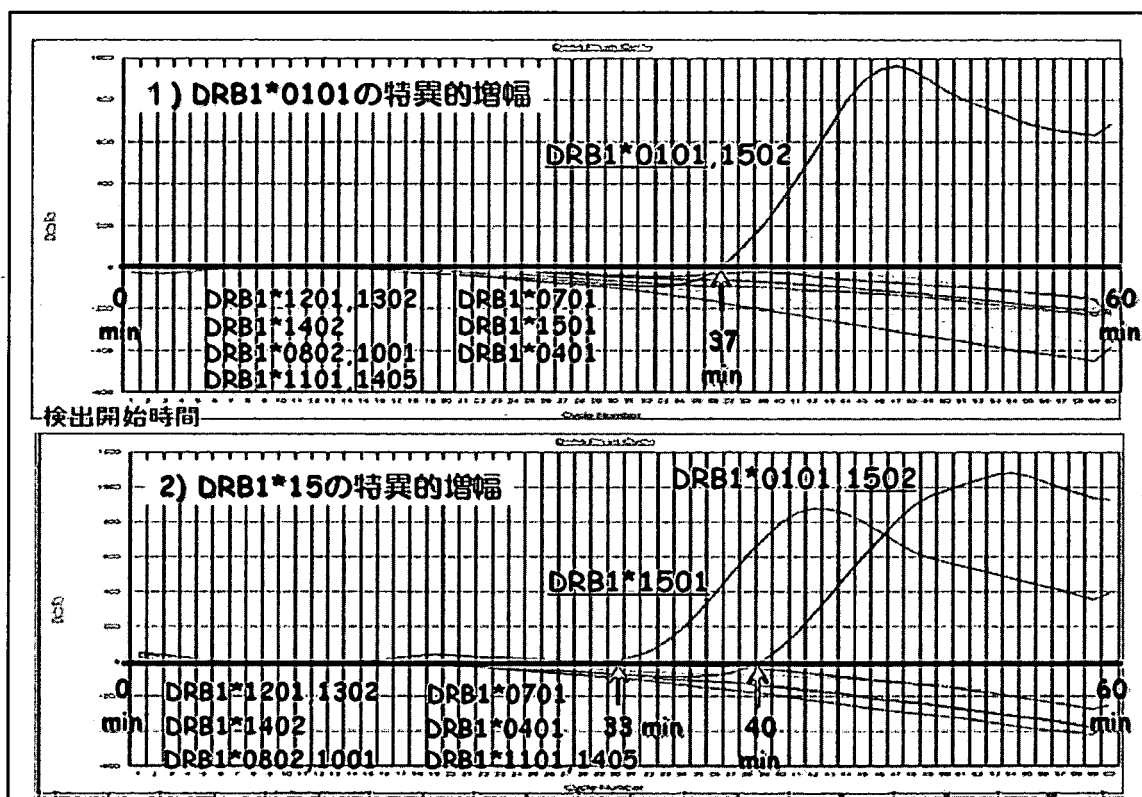


図 55 HLA-DRB1 アリルにおけるグループ分けおよび各群の特異的増幅曲線
 縦軸は二本鎖 DNA に結合した SYBR GreenI 由来の蛍光強度、横軸は反応時間 (分) である(以下同じ)。

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。

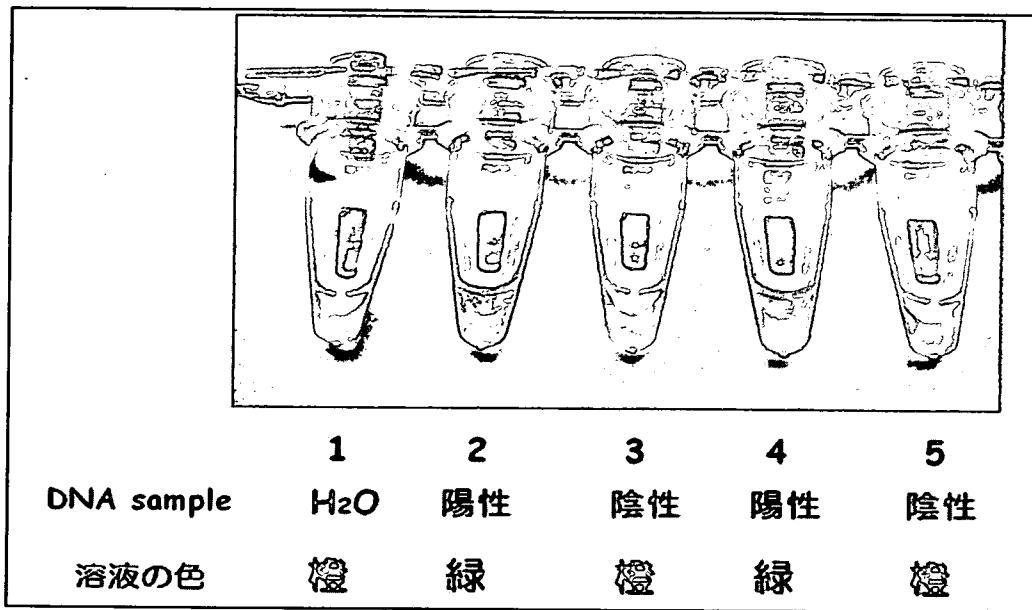


図 56 HLA-DRB1 アリルにおける SYBR GreenI 滴下による目視判定

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。

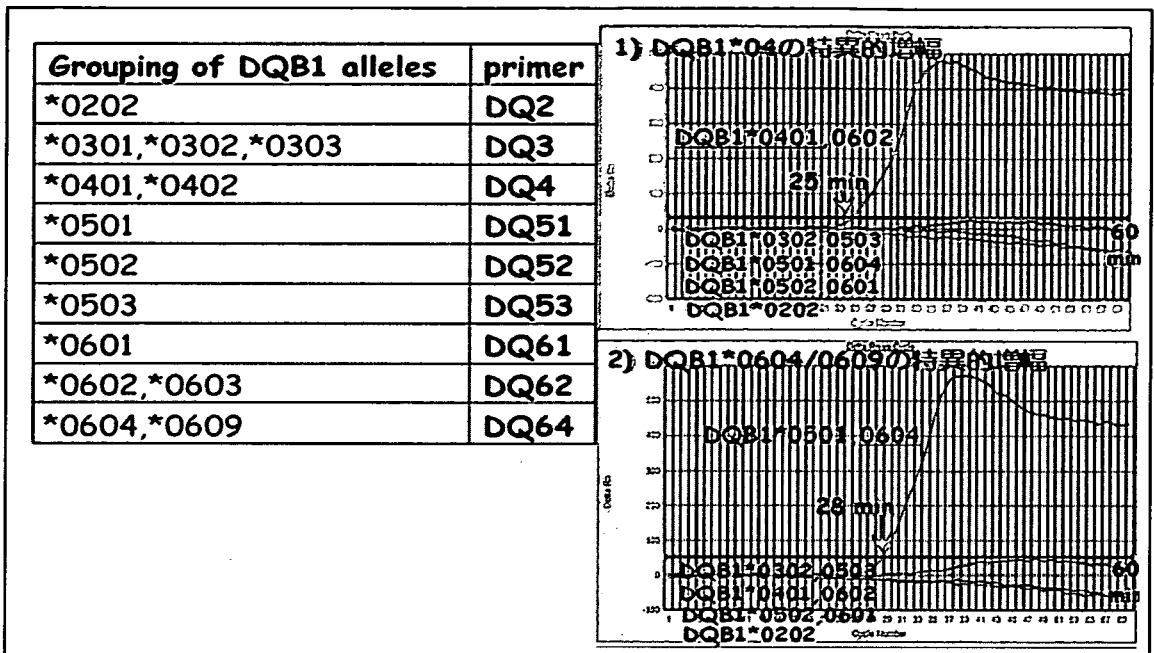


図 57 HLA-DQB1 アリルにおけるグループ分けおよび各群の特異的増幅曲線
HLA-DQB1 アリルを 9 群のグループに分けた。

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。

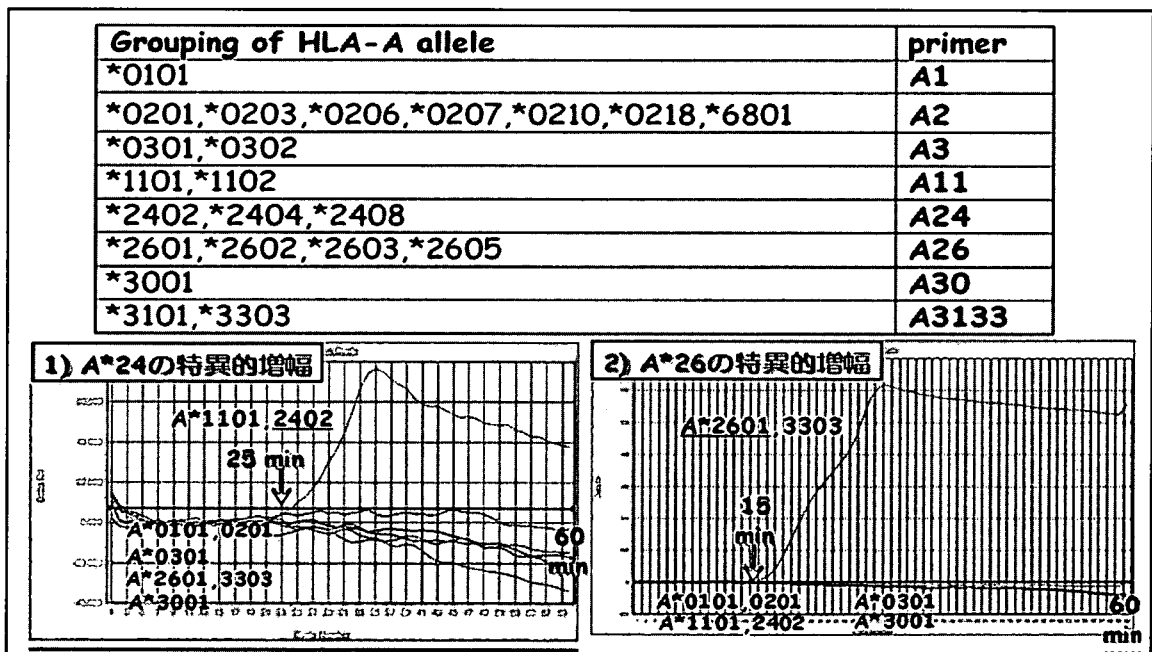


図 58 HLA-A アリルにおけるグループ分けおよび各群の特異的増幅曲線
HLA-A アリルを 8 群のグループに分けた。

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。

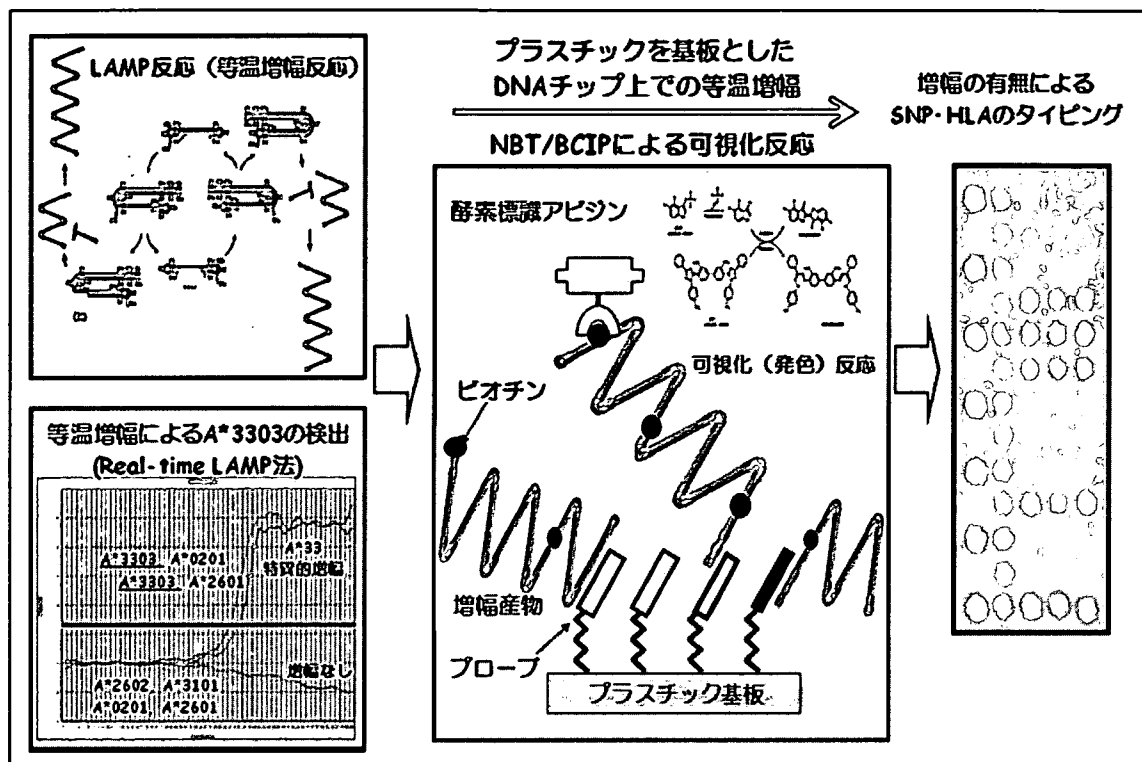


図 59 プラスチックを基板とした DNA チップ上での SNP-HLA のタイピング

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。

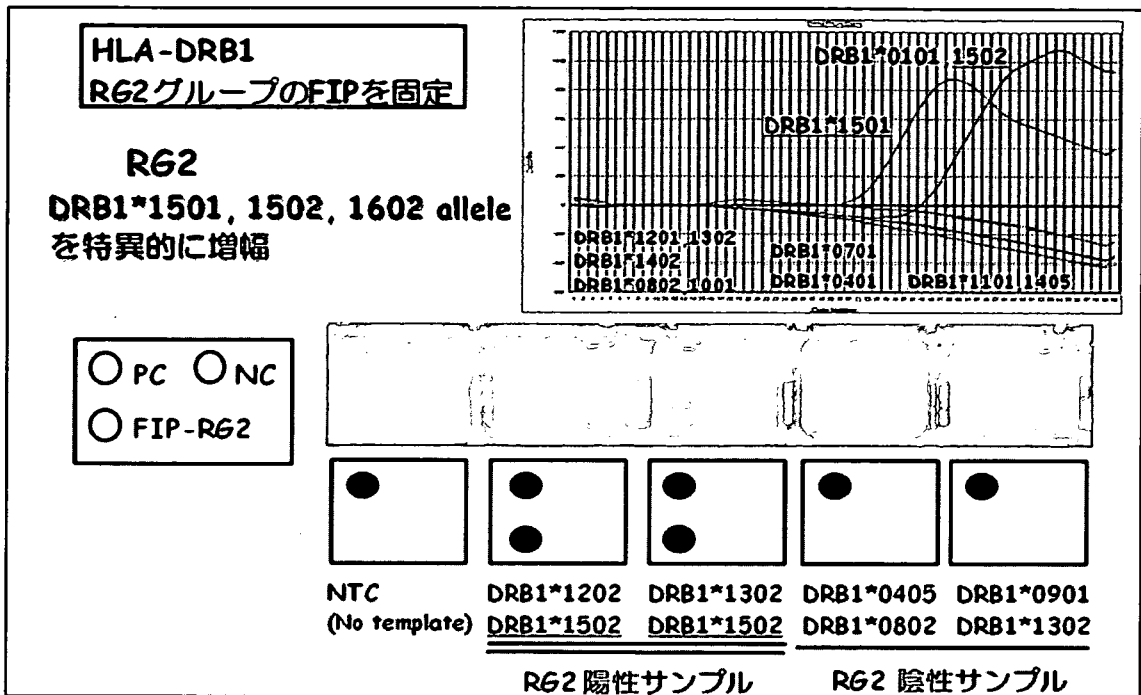


図 60 LAMP-FIP プライマー固定における標的アレルの検出

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。

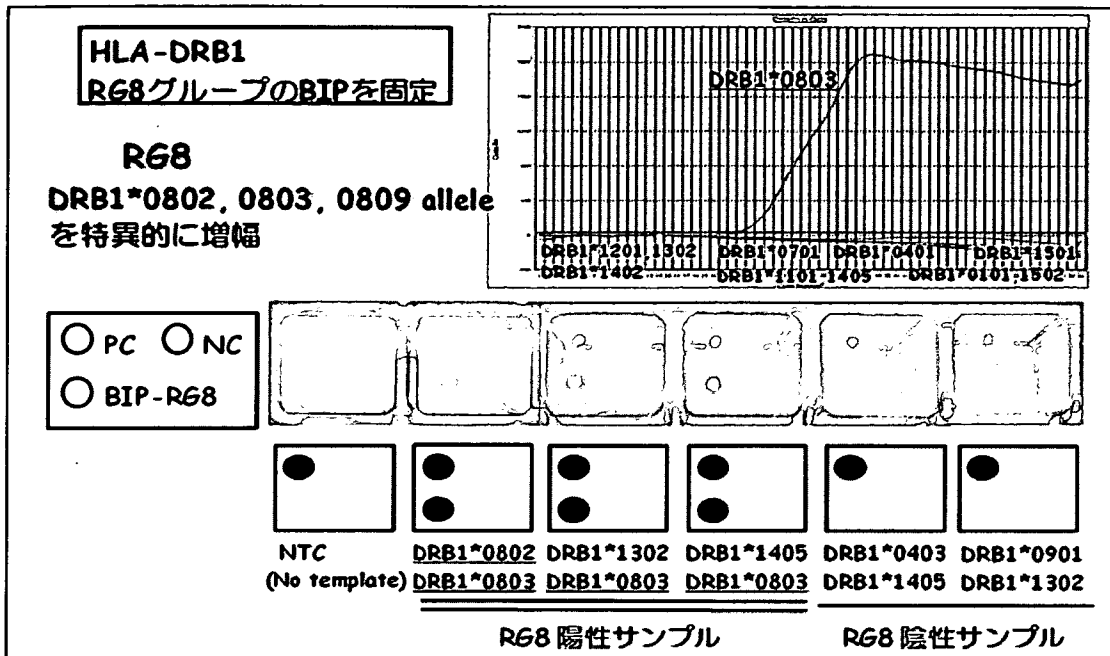


図 61 LAMP-BIP プライマー固定における標的アレルの検出

HLA-DRB1 において RG8 群 (HLA-DRB1*0802, 0803, 0809 アレ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。