

B103 逆ミセルを用いた機能性核酸の効率的抽出プロセスの開発

(神戸大院工)○(学)石津 直樹 (正)丸山 達生* (九大院工院)(他)細木 卓也 (正)後藤 雅宏
(神戸大院・工) (正)大向 吉景 (正)松山 秀人

1. 緒言

核酸には遺伝情報の保存・伝達だけでなく、アプタマーやRNA干渉等に代表される新たな機能が発見され医療分野等への応用が進められている。今後、機能性核酸の実用化のためには正確かつ大量処理が可能な技術が必要となってくる。そこで本研究では、液液抽出法による短鎖DNAの塩基配列特異的分離精製技術の開発を目的とした。まず、標的DNAを水相から有機相へと抽出するために逆ミセルを用いた。同時に、選択性を付与するため抽出対象DNAと相補的なDNAの末端に疎水基を結合させたDNA界面活性剤を導入し選択的抽出を行った。そして、標的DNAの効率的な抽出が可能となるよう様々な条件下で検討した。その後、抽出後も活性が保持されたままであるか確認した。

2. 実験方法

N-hydroxylsuccinimide化したオレイン酸に5'末端アミノ化DNAを反応させ、その後HPLCによって精製することでDNA界面活性剤を得た。

MgCl₂ (10 mM)、EDTA (1 mM)を含むTris-HCl buffer (10 mM)にFITCラベル化DNA (22 mer, 25 nM)およびDNA界面活性剤 (25 nM)を添加し、水相とした。そして、Dilauroyl phosphatidylcholine (DLPC 10 mM)および補界面活性剤として1-ヘキサノール (240 mM)をイソオクタンに添加し抽出用の有機相とした。両相を4種の量比の条件下(有機相/水相=2/1, 1/1, 2/1, 4/1)で接触させ、25°Cで3時間静かに攪拌し正抽出を行った。攪拌後、有機相の蛍光を測定し抽出率を算出した。

正抽出後、有機相を新たな水相と接触させブタノールを添加した後、激しく攪拌することでミセルを破壊した。その後、遠心分離を行うことによって標的DNAを水相へ移動させた。さらに、高温下で再び抽出作業を行うことによりDNA界面活性剤を取り除くことで標的DNAのみを得た。

抽出作業前後の標的DNA(トロンビンアプタマー)とセファロースに固定化したトロンビンを反応させ、トロンビンDNAアプタマーの結合活性の確認を行った。

3. 結果及び考察

Fig. 1に正抽出の際の、有機相と水相の比と抽出率の関係を示す。図より、水相に対する有機相の量が増加するにつれ抽出率が増加することが確認された。

正抽出を行った後、標的DNA(トロンビンアプタマー)のみを回収し、抽出前後のトロンビンとの結合率を算出した結果をFig. 2に示している。ここでは比較対象としてミスマッチDNAの結合率も示している。アプタマーが抽出前後で結合率がほぼ同程度であることから抽出過程で活性が失われず、抽出後も活性を保ったままであるという結果が得られた。

これらの結果より、逆ミセルおよびDNA界面活性剤を用いることで、単鎖核酸の機能を失うことなく効果的に抽出を行えるということが確認された。

参考文献

Maruyama T, Hosogi T, Goto M, *Chem. Commun.* 4450-4452 (2007)

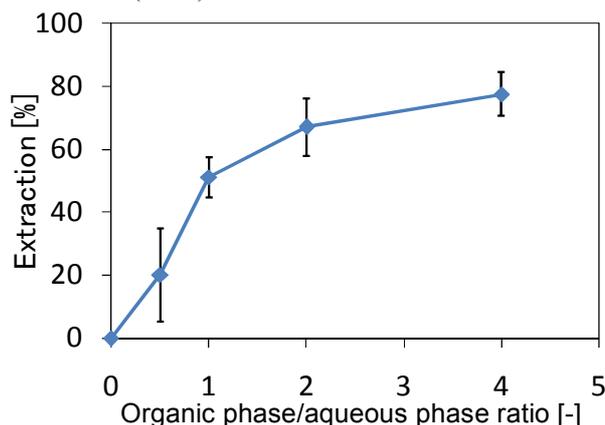


Fig. 1 Effect of the ratio of the organic phase to the aqueous phase on DNA extraction.

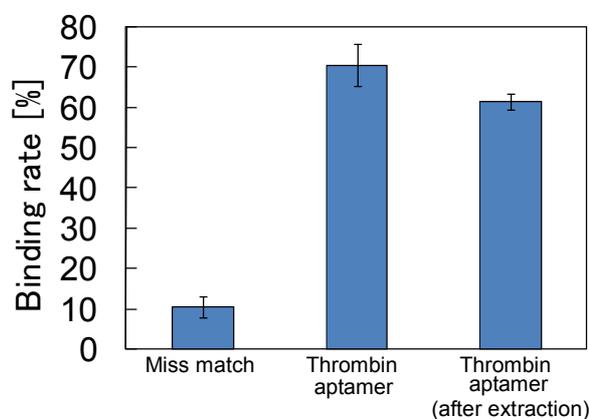


Fig. 2 Binding ability of thrombin-binding aptamer before and after extraction.

* TEL/FAX: 078-803-6070

E-mail: tmarutcm@crystal.kobe-u.ac.jp