

L16

DNA-酵素マルチラベル化プローブを用いた超高感度 DNA 検出

(九大工)○多田 裕・(九大院工)(正)神谷 典穂・(正)後藤 雅宏

【緒言】

検体ゲノム中の特定の DNA 塩基配列検出を行うゲノムサザンプロットは、遺伝子解析のツールとして重要である。これまでは、ゲノム中の微量な標的 DNA を検出するため、高感度検出が可能な放射性同位体 (RI) 標識 DNA プローブが用いられてきた。しかし、RI は安全性や半減期などの問題があり、汎用的な手法とは言い難い。そのため、高感度かつ安全なプローブが求められている。

そこで本研究では、酵素によるシグナル増幅能を利用した超高感度 DNA プローブの創製を目的とする。その DNA プローブの調製スキームを Fig. 1 に示す。アジド修飾 dUTP (N_3 -dUTP) を合成し、PCR によりアジド導入 DNA (N_3 -DNA) を調製する。有機化学的にアルキンを修飾した大腸菌由来アルカリホスファターゼ (BAP) を、 N_3 -DNA とクリック反応 (Huisgen 環化反応)¹⁾により結合させ、BAP マルチラベル化 DNA (プローブ) を調製する。今回は N_3 -DNA の調製及びプローブの評価を行った。

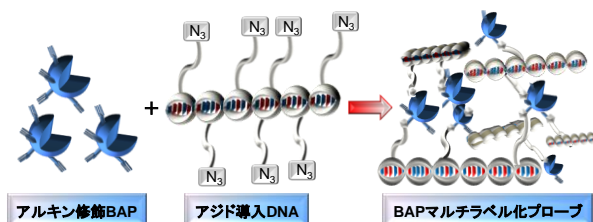


Fig. 1 本研究の概念図

【実験操作】

1. N_3 -DNA の調製

(dTTP + N_3 -dUTP) 濃度を一定 (0.4 mM) として、 N_3 -dUTP の濃度比を変化させ、PCR を行い N_3 -DNA を調製した。アガロースゲル電気泳動ならびに構成ヌクレオチドを直接定量することによって、DNA への N_3 -dUTP 導入の評価を行った。

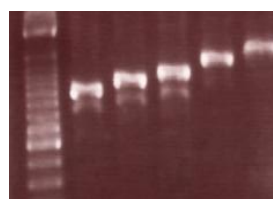
2. プローブによる相補鎖特異的な検出

N_3 -dUTP 比率が 0%、40% の N_3 -DNA に熱処理を施した後、アルキン修飾 BAP とクリック反応により架橋してプローブを調製した。異なる濃度で標的 DNA を固定したメンブレンにプローブを滴下し、一晩反応させた。酵素の化学発光基質を添加し、15 分集光することで、相補鎖検出を行った。

【結果及び考察】

1. N_3 -DNA の調製

N_3 -dUTP 比率を変化させて調製した DNA のアガロースゲル電気泳動の結果を Fig. 2 に示す。その結果、 N_3 -dUTP 導入量の増加に伴い、バンドが高分子量側にシフトしたことから、 N_3 -dUTP が濃度に依存して DNA に取り込まれたことが示唆された。この結果は、プローブを構成するヌクレオチドの直接的な解析によっても支持された。



Lane 1 : DNAマーカー
Lane 2 : N_3 -dUTP比率0%
Lane 3 : N_3 -dUTP比率20%
Lane 4 : N_3 -dUTP比率40%
Lane 5 : N_3 -dUTP比率60%
Lane 6 : N_3 -dUTP比率80%

1 2 3 4 5 6

Fig. 2 N_3 -dUTP 比率変化による N_3 -DNA の調製

2. 相補鎖特異的な遺伝子検出

調製したプローブによる相補鎖特異的な DNA 検出実験を行った結果を Fig. 3 に示す。 N_3 -DNA (40%) とアルキン修飾 BAP をクリック反応させたプローブにより、10 pg の標的 DNA の検出に成功した。一方で、非相補鎖 DNA を固定したメンブレンでは、シグナルが検出されなかったことから、このプローブの配列特異的な検出が可能であることが示唆された。しかし、 N_3 -DNA (0%)を用いた場合においても、シグナルが観測された。これは、プローブにラベルされた BAP の非特異的な吸着によるものと推察される。

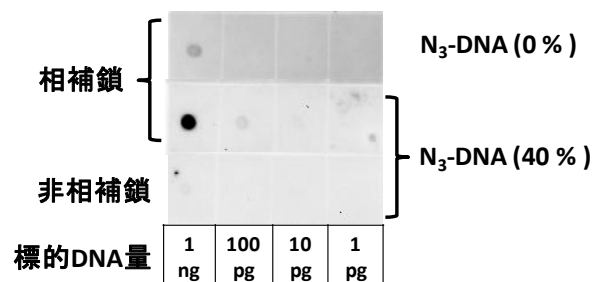


Fig. 3 BAP マルチラベル化 DNA のプローブ能評価

【結言】

アジド基 (N_3) が複数箇所導入された DNA を酵素 (BAP) と架橋して調製した新規核酸プローブにより、10 pg の標的 DNA の検出に成功した。

【参考文献】

1) Johannes G. et al., *Org. Lett.*, 8, 3639 (2006)