

マイクロフルイディクスを用いた BEAMing 法の基礎検討

Fundamental evaluation of BAMing with microfluidics

シスメックス株式会社 中央研究所¹

°山脇 幸也¹、川本 泰子¹、中野 毅¹、田川 礼人¹

°K. Yamawaki, Y. Kawamoto, T. Nakano, A. Tagawa

E-mail: Tagawa.Ayato@sysmex.co.jp

【諸言】 高感度遺伝子変異検出技術である BEAMing(Beads, Emulsions, Amplification, Magetics)法による血中の微量な ctDNA(circulating tumor DNA)の検出が提案されている[1]。BEAMing 法は Pre-amplification / Beads emulsification / Emulsion PCR / Emulsion break / Hybridization / Flow cytometry の各工程を用手法で順次実施する。今後、大規模な臨床試験が求められているため [2]、本技術の自動化を目的としてその全工程のマイクロフルイディクス化を検討している。本研究ではその一部工程の初期評価を実施したので結果について報告する。

【実験方法と結果】 pre-Amplification は 3 つの異なる温度のホットプレート上に蛇行流路（流路幅 200 μm 、高さ 100 μm ）を設置、微量な template DNA と PCR Master Mix の混合液を通液することで DNA 増幅を確認した。Beads emulsification は Fig. 1(a)に示す microfluidic flow focusing を用いた。BEAMing では液滴 1 個に対して DNA1 分子とプライマーをコートした磁性ビーズ 1 個を封入する必要がある。ポアソン分布を考慮し、20 μL の DNA/PCR Master Mix 溶液から直径 7.81 μm 以下の液滴を 8000 万個以上形成することで液滴 10 個に対して DNA と磁性ビーズをそれぞれ 1 個封入することを目標とした。マイクロフルイディクスを用いて形成したビーズ封入液滴を Fig. 1(b)に示す。画像解析(Image-pro plus, Media Cybernetics)の結果、液滴直径は 7.45 μm 、ビーズ充填率は 7.25 %であった。10 分間に 9242 万個の液滴を生成して、670 万個のビーズを封入することに成功した。サーマルサイクラ（GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems）での Emulsion PCR 後も液滴は保持されていた。また、用手法でアルコールによる Emulsion Break、サーマルサイクラを用いた Hybridization による蛍光標識を実施後、フローサイトメータ(ACCURI C6, BD)を用いて Fig. 1(c) に示すように野生型/変異型 DNA 由来と思われる蛍光シグナルを確認した。

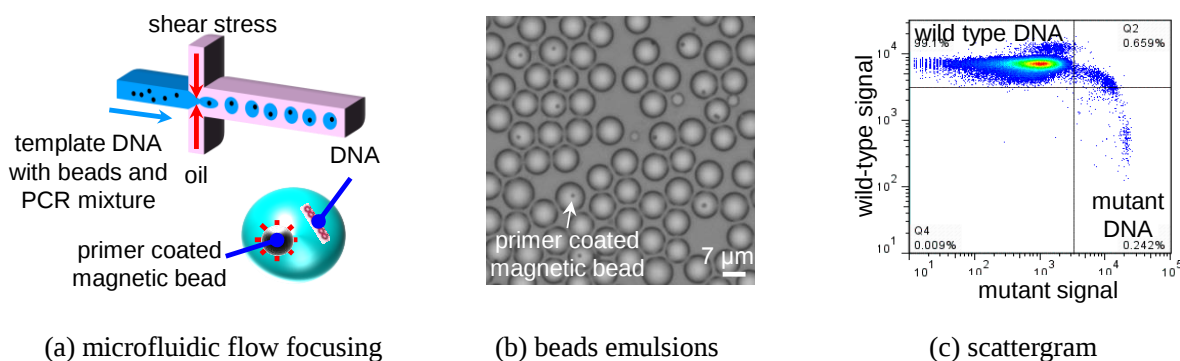


Fig. 1 Beads emulsification with microfluidics

【参考文献】 [1] B. Vogelstein and K. Kinzler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 236-9241, 1999.

[2] Elen Heitzer et al., Clinical Chemistry, 61, 112-123, 2015.