

DNA マイクロアレイのプローブ固定化量による検出感度の検討

Detection sensitivity based on probe immobilization amount in DNA microarray

横河電機¹ °宮内 祐樹¹, 蓼沼 崇¹, 田口 朋之¹, 田名網 健雄¹

Yokogawa¹ °Yuki Miyauchi¹, Takashi Tadenuma¹, Tomoyuki Taguchi¹, Takeo Tanaami¹

E-mail: Yuuki.Miyauchi@jp.yokogawa.com

諸言: 微生物の遺伝子検査などに用いられる DNA マイクロアレイ[1]において, 蛍光修飾したオリゴ合成プローブおよび消光分子を修飾したオリゴ合成プローブが相補な配列で一部結合して一対になるように基板上に固定化した FRET プローブがある. この FRET プローブは閉じた状態では消光状態でありターゲット DNA がハイブリダイズした状態では消光が解かれ蛍光が検出される. この FRET プローブの検出の感度は消光状態と発光状態の光量変化により決定している. 基板上に固定化する FRET プローブの濃度により消光状態と発光状態の光量に変化があることを確認し, 最適な濃度条件を検討した.

実験方法: Cy3 蛍光分子を修飾した蛍光プローブと BHQ2 分子を修飾した消光プローブからなる FRET プローブの濃度を 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78 μM に調製し, 基板に対して $\phi 150 \mu\text{m}$ のスポットピンで FRET プローブを固定化し蛍光スポットを作製した. 使用した FRET プローブと相補である配列を持つように PCR で調製した鎖長 500 mer の一本鎖 DNA ターゲットを 5.0 nM 含むハイブリダイズ溶液とスポットを 60°C, 30 分インキュベートすることで反応させた. また消光状態の光量を確認するため, 一本鎖 DNA ターゲットを含まないハイブリダイズ溶液をアプライした状態においても同様の反応をおこなった. 発振波長 533 nm のレーザーを励起光源として使用し, ダイクロイックミラー, バリアフィルタからなる検出波長 575-645 nm の落射型の蛍光検出光学系を介して冷却 CCD カメラによって蛍光画像を取得し蛍光強度を検出した.

結果と考察: 消光状態およびハイブリダイズによる発光状態の蛍光強度を確認したところ, 消光状態の光量はプローブ濃度が高くなるに従い増加し, 25 μM 付近で最大となり 50 μM で低下した. 発光状態の光量は 50 μM 付近で増加が緩やかになることから, 50 μM で FRET プローブが十分に基板に飽和したことにより発光状態の信号が十分に検出されたと考えられる. 50 μM ではプローブの高密度化により蛍光分子と消光分子の距離が近づくことで, 分子間距離に依存する FRET 効率が上がり消光状態の光量を低減できると考えられる. 発光状態の蛍光を S, 消光状態の蛍光を N として, 消光状態の光量が最大となる 25 μM まで SN 比は濃度が 2 倍になると 10-20%程度増加するが, 25 μM から 50 μM の変化で SN 比の上昇が 2 倍程度になることを確認した.

参考文献: [1] 三森裕示, 蓼沼崇, 田口朋之, 宮内祐樹, 加藤暁之: 新規 DNA チップ技術を用いた微生物検出システムの開発, 日本防菌防黴学会第 43 回年次大会要旨, p.61, 2016.