

シグナリングアレイプローブの蛍光強度補正による感度向上の検討

Sensitivity improvement by fluorescence intensity correction of signaling array probes

横河電機¹ ◦宮内 祐樹¹, 蓼沼 崇¹, 田口 朋之¹

Yokogawa¹ ◦Yuki Miyauchi¹, Takashi Tadenuma¹, Tomoyuki Taguchi¹

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

諸言: 微生物遺伝子検査などに用いられる DNA マイクロアレイにおいて、蛍光色素を修飾した蛍光プローブおよび消光分子を修飾した消光プローブが相補な配列で一部結合し閉じた状態で対になるように基板上に固定化した SAP (シグナリングアレイプローブ) がある[1]. SAP は励起光を与えたとき、励起された蛍光分子のエネルギーが FRET (Fluorescence resonance energy transfer) により消光分子へエネルギーが移動し消光状態になる. そして、ターゲット DNA がプローブにハイブリダイズした状態では SAP が開き消光が解かれて蛍光が検出される[2]. しかし、SAP の固定化量などのばらつきが存在し、ターゲットのハイブリダイズによる光量変化の定量性に影響するという課題がある. 本報告では蛍光分子をドナー蛍光分子とし、消光分子をアクセプタ蛍光分子に変え、SAP が閉じた状態のドナーのエネルギーがアクセプタに移動しアクセプタ蛍光が検出されることを確認した. そこから SAP が閉じた状態のアクセプタ光量をアクティブに検出しドナー光量を補正することで定量性の向上を検討した.

実験方法: Cy3 蛍光分子を修飾したドナープローブと Cy5 蛍光分子を修飾したアクセプタプローブを各 10 μM に混合調製し、基板に $\phi 150 \mu\text{m}$ のピンで固定化し DNA マイクロアレイを作製した. ドナープローブと相補配列を持つように PCR で調製した鎖長 144 mer の一本鎖ターゲット DNA を 10~1.25 nM の濃度水準でスポットにアプライして 60°C, 30 分インキュベートすることで反応させた. また未反応の N 光量を確認するため、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におこなった. 発振波長 532 nm のレーザ励起光源、ダイクロイックミラー、バリアフィルタからなる落射型の蛍光検出光学系を使用し、冷却 CCD カメラによって蛍光画像を取得して蛍光量を計測した. ドナー、アクセプタの蛍光検出波長はそれぞれ 572.5-647.5 nm, 662.5-737.5 nm である.

結果と考察: SAP が閉じた状態およびターゲットがハイブリダイズした状態のドナーとアクセプタの発光状態を確認した結果、ドナー光量はターゲット濃度が高くなるに従い増加し、アクセプタ光量は減少した. また、ターゲットがないときのアクセプタ光量がドナーの光量と等量になるようにアクセプタ光量に乗算する係数を設定し、各ターゲット濃度でのアクセプタの光量に設定した係数をかけた数値をドナーの光量から減算した補正光量を算出した. ドナー光量のターゲット濃度に対する回帰直線の傾きに対して補正光量の傾きは約 1.3 倍感度が増加し、回帰直線の濃度の標準誤差 σ は 0.5 nM から 0.2 nM に減少し約 2.4 倍定量性が増加する可能性を確認した.

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.

[2] 宮内祐樹, 蓼沼崇, 田口朋之, 田名網健雄: 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, 第 79 回応用物理学会秋季学術講演会講演予稿集, 01-064, 2018.