

蛍光偏光法を用いた DNA 測定における遺伝子増幅法の迅速・簡便化

Fluorescence polarization method for detecting specific gene sequence combined with NASBA amplification, and optimization of the conditions for NASBA

東京工科大学大学院 工学研究科¹ 東京工科大学², [○](M1)市川 泰弘¹, 湯沢 友之², 鶴岡 誠^{1,2}

Tokyo University of Technology Graduate School of Engineering¹,

Tokyo University of Technology², [○]Yasuhiro Ichikawa¹, Tomoyuki Yuzawa², Makoto Tsuruoka^{1,2}

E-mail: tsuruoka@stf.teu.ac.jp

【背景・目的】

当研究室では蛍光偏光法（以下 FP 法）を活用して遺伝子計測を行っている。測定感度の観点から微生物については、一次培養→熱エタノール処理 (NCEP) →遺伝子増幅→蛍光偏光度（以下 FP 値）計測 という手順で遺伝子検出操作を行っている。従来、上記「遺伝子増幅」として非対称 PCR 法を用いているが増幅の速度や増幅装置の複雑さを考慮し、NASBA 増幅法と FP 法との組合せを検討している。NASBA 法は一定温度で増幅ができ、増幅時間も 45～90 分と通常の PCR 法より時間短縮が可能である。しかし最近の研究により、NASBA 法は上記 NCEP 産物中のエタノール等により増幅反応が阻害されることが分かって来た。本研究では、上記組合せによる FP 法のための NCEP および NASBA の条件最適化を行ったので報告する。

【実験方法】

緑膿菌の特異的塩基配列にのみ結合する蛍光標識 DNA プローブを用いた。実験用の微生物サンプルは緑膿菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌の 3 種（三大常在菌）とした。これらの培養産物をそれぞれ 80%エタノール中で 15 分間熱処理し、この産物を NASBA 用の基本テンプレートとした。ただしこの産物には高濃度のエタノール等が含まれるため、純水にて 2 倍希釈系列をつくり検討した。それぞれの希釈テンプレートを用いて NASBA 増幅を行い 1 本鎖 RNA として増幅し、簡易遠心機にて微生物残滓等を除去し測定用サンプ

ルとした。このサンプル 5 μ L を緑膿菌遺伝子検出用プローブ試薬 5 μ L と混合し、蛍光偏光マイクロプレートリーダーにセットし、1 分間隔で 31 回の FP 値計測を行った。

【結果・考察】

本研究では NCEP による微生物処理溶液を 16 倍まで希釈したとき、NASBA 産物の FP 値が大きく再現性も高いことが判明した。測定結果を Fig.1 に示す。同図の縦軸は FP 値（Polarization と略記）の 1000 倍値を示す。横軸において、C1 は検出試薬のみ、C2 は緑膿菌遺伝子検出用プローブ DNA と相補的で同鎖長の合成 DNA とを混合したもの、C3 は同プローブとテンプレートの代わりに純水を入れた NASBA 産物とを混合したもの（陰性コントロール）である。緑膿菌(P.a.)を用いたサンプルは高い FP 値を示し、大腸菌および黄色ブドウ球菌（それぞれ E.c., S.a.）のサンプルでは低い FP 値を示した。この結果より、NASBA と FP 法の組合せによる緑膿菌遺伝子の測定が確認された。また三大常在菌における同菌遺伝子検出の特異性も示された。

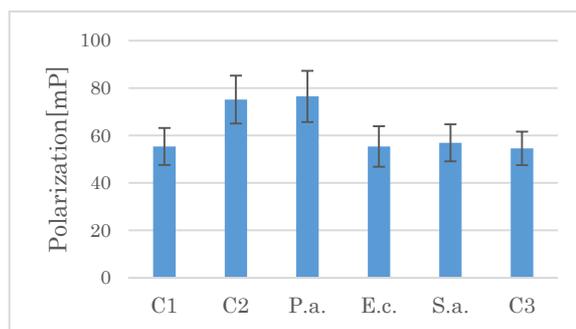


Fig.1 P.a. specific detection