

DNA マイクロアレイにおける蛍光標識核酸の非洗浄観察に関する開発

Detection of Fluorescently Labeled Nucleic Acids on DNA Microarrays in Unwashed

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@yokogawa.com

諸言: 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、蛍光標識された核酸と、マイクロアレイ上に配置された DNA プローブとをハイブリダイズ反応させてプローブ位置の蛍光を観察することにより標的核酸の有無または量を計測する方法が実施されている[1]。ハイブリダイズ反応後は溶液中に未反応の標識核酸がプローブから遊離しており、その蛍光がプローブ位置の蛍光の観察を阻害する要因となる。そのため観察前にマイクロアレイを洗浄し未反応の標識核酸を除去する必要があったが洗浄によって計測の正確性が悪化するという問題があった。そこでプローブから遊離している標識核酸からの蛍光の影響を低減しプローブ位置の蛍光を非洗浄で観察する方法を検討した。標識核酸とプローブとがハイブリダイズしている溶液中に、標識から発せられる蛍光を吸収する吸光物質を添加しマイクロアレイのプローブが固定されていない面から蛍光を観察する方法を提案した。

実験方法: リン酸緩衝液に蛍光分子非標識のプローブを 10 μ M に調製してプローブ固定化用透明基板にスポッティングすることでマイクロアレイを作製した。プローブ塩基配列の相補鎖配列を有し Cy3 蛍光分子を標識した標的核酸を標識核酸とし、標識核酸溶液として 5 $\times$ SSC, 0.25% Triton-X100 中に 0.25 nM に調製した。このとき吸光物質として粒径 50 nm のデキストランコート酸化鉄 (Fe_2O_3) を 50 mg/ml になるように添加した。標識核酸溶液を深さ 0.7 mm のウェルに入れてプローブに接液した状態で保持し、蛍光読取装置によりマイクロアレイのプローブが固定されていない面からプローブの蛍光画像を取得して光量を算出した。標識核酸とプローブとのハイブリダイズ反応はマイクロアレイを 60 $^{\circ}\text{C}$, 5 rpm, 30 分間インキュベートすることで反応を促進し常温に戻してから画像を取得した。

結果と考察: 吸光物質を添加した場合、プローブから遊離している標識核酸からの蛍光が低減し背景光が 1/3.7 に減少した。このときスポット光量と背景光の比を S/N として、吸光物質を添加しなかった時が 1.5 であるのに対して吸光物質を添加した時は 3.7 となり S/N が 2.5 倍向上した。また吸光物質を添加しなかった時と比較して吸光物質を添加した時のスポット光量に光量低下が生じていないことから、吸光物質が標識核酸とプローブとのハイブリダイズ反応を阻害していないことが分かる。よって標識核酸がハイブリダイズ反応したプローブの非洗浄観察への本方法の効果を確認した。また標識核酸の非洗浄観察以外に、非標識の核酸がハイブリダイズ反応したプローブを非洗浄で観察できる方法[2]においてもサンプル由来の自家蛍光の影響を低減した高感度計測への応用が期待される。

参考文献: [1] E. Negoro et al. : Utility of PCR amplification and DNA microarray hybridization of 16S rDNA for rapid diagnosis of bacteremia associated with hematological diseases. *J Infect Dis* 2013;17:271-276.

[2] 宮内祐樹, 蓼沼崇, 田口朋之: 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, 第 80 回応用物理学会秋季学術講演会講演予稿集, 01-075, 2019.