

# DNA の高感度化学発光画像検出法の開発と応用

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 山筋 睦美

## 【目的】

疾病の原因遺伝子の同定や、その機能解析は重要な研究課題である。膨大な遺伝子情報の中にある特定の遺伝子を高感度に検出できる分析法が開発されており、中でも化学発光は極めて微弱な光を感度良く検出できることから、幅広く利用されつつある。当研究室では、DNA のグアニン塩基と特異的に縮合反応し、化学発光を生じる 3,4,5-トリメトキシフェニルグリオキサール (TMPG)を開発している。そこで、本研究では安価な固相膜を用い、固相膜上の DNA を TMPG 試薬によって簡便かつ高感度に検出できる手法を確立した。さらに、この確立した TMPG 化学発光法を、老化や腫瘍化に関与しているテロメア DNA の検出法へ応用した (Fig. 1)。続いて、より高感度にテロメア DNA を検出することを目的として、デキストランに多数の西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を導入したプローブを合成し、このプローブをテロメア DNA の化学発光画像検出に適用した (Fig. 2)。

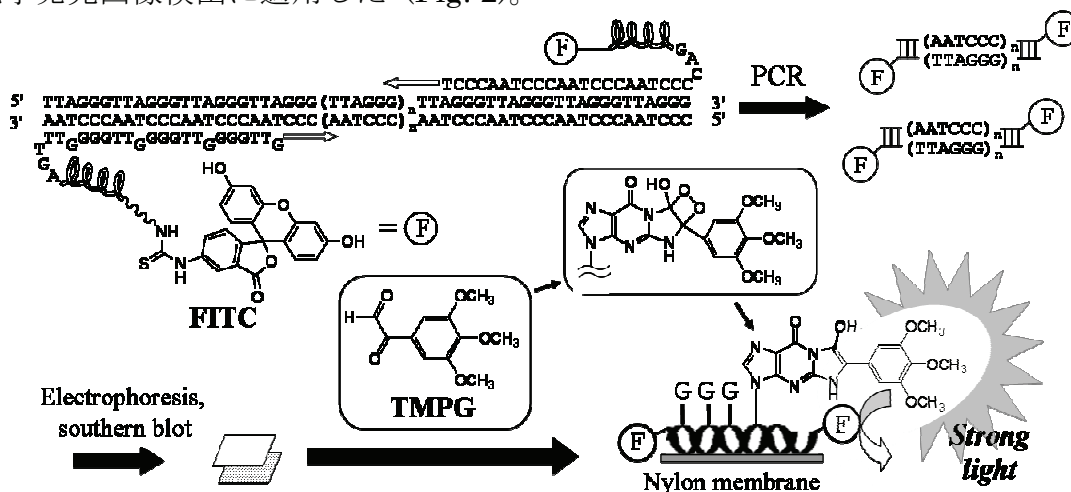


Fig. 1 Schematic protocol for CL determination of telomere DNA by TMPG.

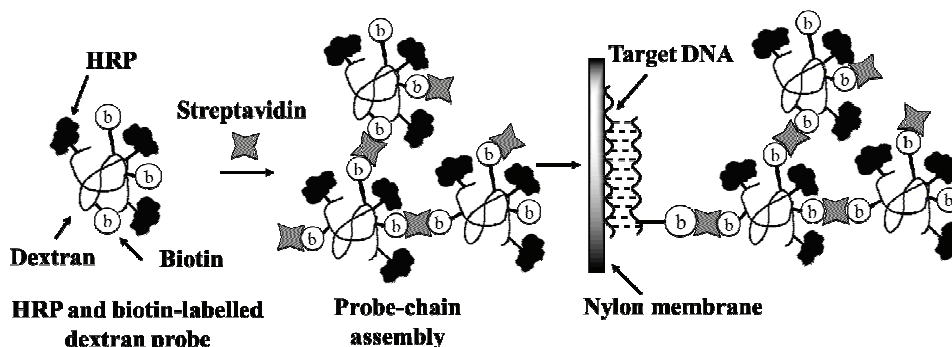


Fig. 2 Schematic protocol for CL detection of a target DNA by use of HRP and biotin-labelled dextran probe. Conjugation of the HRP and biotin-labelled dextran probe via streptavidin resulted in the formation of a probe-chain assembly. This assembly recognized the biotinylated cDNA that hybridized with the target DNA.

## 【結果と考察】

### 1. 固相膜上での DNA の化学発光画像検出

親水性膜であるナイロン膜に DNA を吸着させ、TMPG との反応条件を検討した結果、テトラ-*n*-プロピルアンモニウムリン酸塩 (TPA) 存在下、TMPG の溶媒に DMF を用いることによって、最も強い発光が得られた。一方、疎水性膜である polyvinylidenedifluoride (PVDF) 膜を用い、同様に反応条件を検討したところ、TMPG の溶媒に DMF と THF の割合が 7:3 の混液を用いることで、比較的強い化学発光が得られることが分かった。これにより、ナイロン膜及び PVDF 膜上の DNA をそれぞれ 5.0 ng 及び 10 ng (S/N=3) まで検出できた。これらの結果、膜を TPA 溶液に浸漬してから化学発光検出終了まで、約 2 分以内で行うことができる簡便な手法を新しく開発した。

### 2. FITC 標識プライマーを用いた膜上のヒトテロメア DNA の化学発光画像検出法の開発

DNA が吸着しやすいナイロン膜を用い、TMPG 反応によってヒトテロメア DNA を高感度に検出できる手法の開発を試みた。本研究で、TMPG 反応によって生じる DNA の化学発光は、フルオレセイン-5-イソチオシアネート (FITC) を DNA に共有結合させることによって、増強することを見出した。そこで、ヒト細胞に含まれるテロメア領域を、FITC 標識プライマーを用いた PCR によって増幅した。PCR 生成物を電気泳動にて分離後、ナイロン膜に転写し、TMPG 反応によって化学発光検出した (Fig. 3)。この結果、非標識プライマーを用いた場合と比較して、約 10 倍強い発光が得られた。また、この TMPG 検出法によって、1.6-25 ng/lane のゲノム DNA に含まれるテロメア DNA を高感度かつ定量的に検出できた。この時、ナイロン膜上の PCR 生成物の検出限界は約 0.3 ng であり、ヒト細胞 (45 細胞) に含まれるテロメア DNA を検出することができた。本法は、FITC 標識プライマーを用いて、細胞内の様々な遺伝子発現を調べるための有用な手法と成り得るものと示唆される。

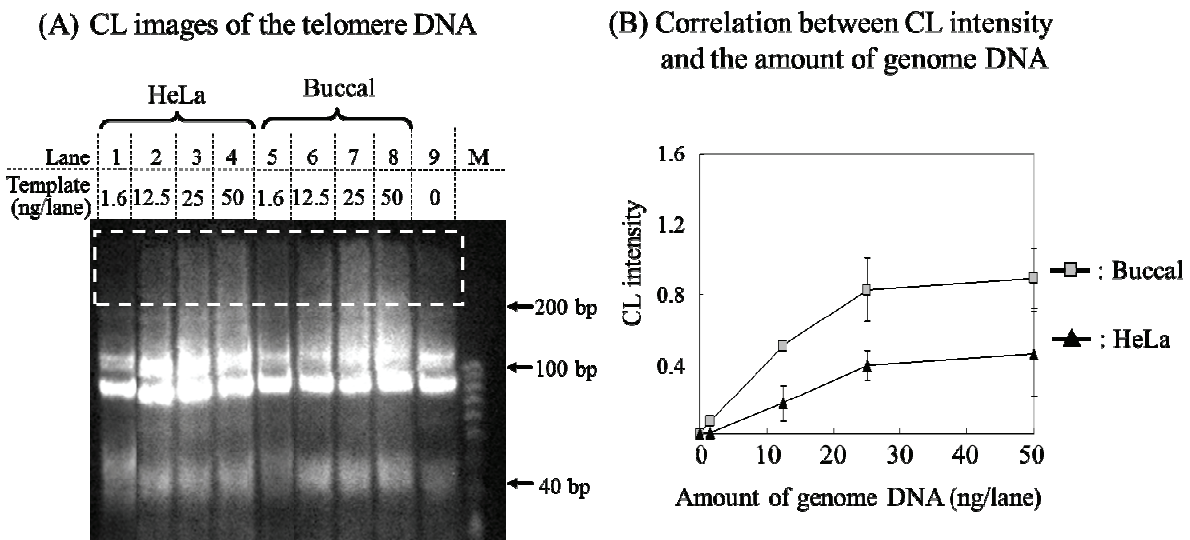


Fig. 3 (A) CL image and (B) its intensities ( $n=3$  each) of the FITC-containing PCR products from telomere DNA in small numbers (ca. 45-1400 cells) of HeLa cells and human normal buccal mucous cells. The amounts (ng per lane) of genome DNA were 1.6 ng for lanes 1 and 5, 12.5 ng for lanes 2 and 6, 25 ng for lanes 3 and 7, and 50 ng for lanes 4 and 8. Lanes: 1-4, HeLa cells; 5-8, buccal mucous cells; 9, in the absence of genome DNA; M, DNAs markers. The CL intensities in white rectangle area were measured.

### 3. HRP 導入デキストランプローブを用いた膜上のヒトテロメア DNA の化学発光画像検出法の開発

HRP 導入デキストランプローブを、テロメア DNA 検出用プローブとして用いる手法について検討した。2. で確立した手法を基に、ビオチンで標識したプライマーを用いて PCR を行い、PCR 生成物を分離後にナイロン膜に転写した。ビオチンを含む PCR 生成物に、ストレプトアビジン(SA)と HRP 導入デキストランプローブが連鎖している複合体を結合させた(Fig. 4)。この結果、既存の化学発光性プローブを用いる手法よりも約 10 倍強いテロメア DNA に由来する化学発光シグナルが得られた。また、バックグラウンドも低いものであった。これにより、膜上の 2.6-24 ng/lane のゲノム DNA に含まれるテロメア DNA を高感度かつ定量的に検出できた。また、本手法は TMPG 検出法よりも約 6 倍高い感度を示した。本研究で開発した HRP 導入デキストランプローブは、生体内のビオチン化した微量成分の検出用プローブとして適応可能であると考えられる。

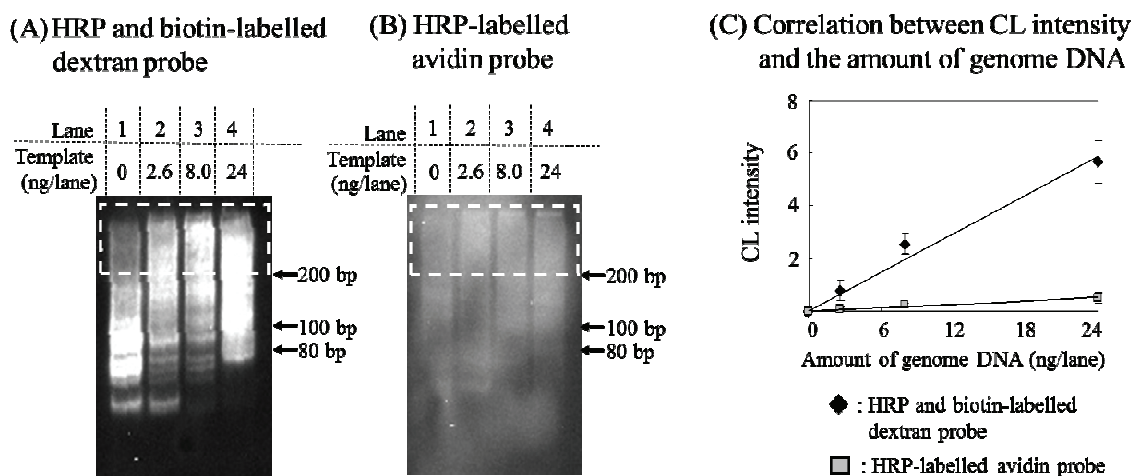


Fig. 4 CL images of the biotin-containing PCR products from telomere DNA in human normal buccal mucous cells using (A) HRP and biotin-labelled dextran probe and (B) HRP-labelled avidin probe, and (C) their intensities (n=3 each). The amounts (ng per lane) of genome DNA: 0 ng (lane 1), 2.6 ng (lane 2), 8.0 ng (lane 3), 24 ng (lane 4). The CL intensities in white rectangle area were measured.

以上、TMPG 試薬を用い、ヒトテロメア DNA を検出できる手法及び HRP 導入デキストランプローブを用い、SA と連鎖的に結合させることで約 6 倍高感度にテロメア DNA を検出できる手法をそれぞれ開発することができた。これらの手法は、実際の医療現場や、生体機能解明研究に大いに貢献できると期待される。

#### 【基礎となった学術論文】

- 1) M. Yamasuji, T. Shibata, T. Kabashima, M. Kai., *Anal. Biochem.*, accepted (2011).
- 2) M. Yamasuji, T. Shibata, M.G. Azam, Z. Huan, T. Kabashima, D.M. Williams, M. Kai., *in preparation*.
- 3) K. Tonooka, T. Kabashima, M. Yamasuji, M. Kai., *Anal. Biochem.*, **364**, 30-36 (2007).
- 4) C. Smanmoo, M. Yamasuji, T. Sagawa, T. Shibata, T. Kabashima, D.Q. Yuan, K. Fujita, M. Kai., *Talanta*, **77**, 1761-1766 (2009)