

30TC-am03

遺伝子増幅反応を利用した高感度生物発光イムノアッセイの開発

○潘 裕星¹, 大野 賢一¹, 荒川 秀俊¹(¹昭和大薬)

【目的】当教室ではこれまでにイムノアッセイの標識体として化学的に安定な DNA を用いて、その増幅反応を利用した検出系を開発してきた。本研究では遺伝子増幅反応を高感度に検出するための生物発光法の導入について検討した。即ち、遺伝子増幅法として環状 DNA を鋳型とした Rolling Circle Amplification (RCA) 法を用いて、DNA の伸長反応の際に放出されるピロリン酸 (PPi) を ATP 変換酵素によりホタルルシフェリンールシフェラーゼ反応に導く方法である。そこで環状一本鎖 DNA の高効率な調製法、DNA 伸長反応の最適化及び生物発光検出による高感度定量法について検討した。

【方法】PCR を利用して得られた一本鎖 DNA の環状化を 3 種類の DNA リガーゼにより検討した。次に得られた環状一本鎖 DNA を増幅試薬としてプライマーや dNTPs、さらに 4 種類の鎖置換型 DNA 合成酵素をそれぞれを含む反応用緩衝液に加え、各酵素の至適温度で伸長反応を行い、インターカレート試薬 (SYBR Green II) を用いて伸長反応を蛍光モニタリングした。それと同時に反応液の一部を採取し、生物発光試薬 50 μ L を加えて生じる発光を測定した。

【結果と考察】種々条件検討の結果、T4 DNA リガーゼを用いたパドロックプローブ法により約 30% の収率で目的とする環状一本鎖 DNA を得た。次に、環状一本鎖 DNA を用いてその伸長反応を検討した結果、経時的な蛍光及び生物発光シグナルの増加を観測した。これは DNA 合成酵素の鎖置換活性による連続的な DNA 伸長反応と考えられる。アガロースゲル電気泳動においても様々なサイズの DNA を確認しており、一致した結果である。またプライマーの濃度依存的な発光強度の増加も確認した。現在、イムノアッセイへの応用について検討している。