

◆新素材・先端 チップ内で効率よく遺伝子を増幅・検出する技術◆

病原菌など種々の微生物の遺伝子を調べるには、まず遺伝子を増幅する必要がある。特定遺伝子の増幅法として注目を浴びている、ローリングサークル型増幅(RCA)法の改良のため、本研究では、マイクロチップを用いた RCA 法の開発を試みた。チップの流路内に固定化ビーズを詰め、ビーズ表面で RCA 反応を行ったところ、ビーズ上に増幅産物の蛍光が点として観察された。本法で従来法の90倍の検出効率となる9000分子の微量DNA分子の検出に成功した。少量試料での定量分析が可能であることから、新生児の感染症検査や遺伝子多型の判別などへの幅広い応用が期待される。

【B2007】

マイクロ RCA 法による単一 DNA 分子検出法の開発

(東大院工・ウブサラ大*) 立原淳貴、○佐藤香枝、田中有希*、馬渡和真、Mats Nilsson*、北森武彦 [連絡者：北森武彦、電話 03-5841-7231、E-mail: kitamori@icl.t.u-tokyo.ac.jp]

単一 DNA 分子を解析する方法としてパッドロック RCA (Rolling Circle Amplification) 法と呼ばれる遺伝子増幅法が注目を集めている。この方法の増幅産物は長い一本鎖 DNA で、約 $1\mu\text{m}$ のドット状になり、蛍光標識すると顕微鏡下で観察できる。これをカウントすることで、遺伝子の定量ができると期待されている。しかし、従来の PCR チューブでの RCA 法は検出効率が 0.1% 程度と低く、改善が望まれている。一方、当研究室ではマイクロ化学システムを研究している。そこで、RCA 法をチップ内に固相化することで微量化や検出効率の上昇が実現するものと考えた。本研究では、プライマー固定化ビーズを用いて RCA 法のマイクロ化学チップ化 (マイクロ RCA 法) を試みた。

実験には、途中にダム構造を持つマイクロ化学チップを用いた。流路内にプライマー固定化ビーズを詰め、このビーズ表面で RCA 反応を行ったところ、ビーズ上に増幅産物の蛍光ドットが観察された (図)。この方法で 9000 分子の微量 DNA 分子の検出に成功した。これは検出効率 9% と計算され、従来の PCR チューブでの RCA 法に比べ 90 倍の改善を達成したといえる。さらに、30 amol のサルモネラのゲノム DNA の検出にも成功した。この技術は、少量の試料での定量分析が期待できることから、将来的に、非常に微量な試料しか得られないところ、たとえば、新生児の感染症検査や SNPs など遺伝子多型の検査などへの応用が期待される。

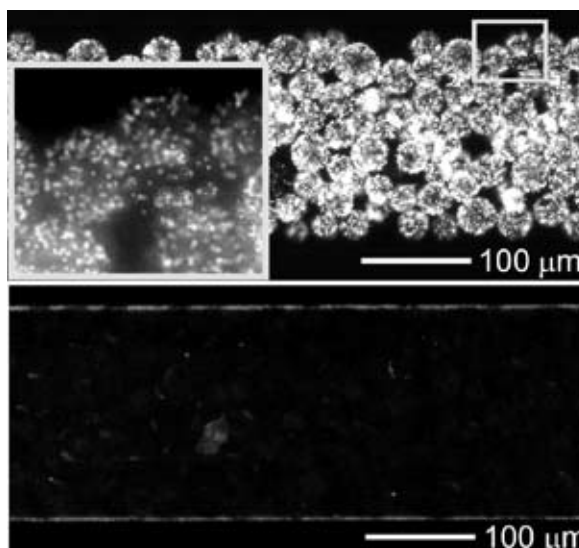


図 マイクロRCA法結果 (上)500 amol (下)0 amol