

等温 PCR を用いたトロンビン検出法の開発

Development of recombinase polymerase amplification-based aptasensor for thrombin detection

黒田 直希¹⁾

指導教員 吉田 亘¹⁾²⁾

1) 東京工科大学大学院 バイオ情報メディア研究科 バイオニクス専攻 エピジェネティック工学研究室

2) 東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科 エピジェネティック工学研究室

キーワード：RPA, アプタマー, グアニン四重鎖構造, トロンビン

1. 背景・目的

本研究では Recombinase Polymerase Amplification (RPA) とアプタマーを用いた新規標的分子検出法を開発することを目的とした。RPA とは等温かつ 20 分程度で DNA を増幅させる方法であり、PCR に比べより簡便かつ迅速に DNA を増幅することが出来る (Fig. 1)。RPA では、まずリコンビナーゼとプライマーが複合体を形成し、プライマーが鋳型 DNA に結合する。その後、一本鎖 DNA 結合タンパク質によって鋳型 DNA が一本鎖になり、それと同時に DNA ポリメラーゼが増幅反応を行い、DNA が増幅される。

アプタマーとは標的分子に特異的に結合する核酸である。アプタマーは抗体と同定の親和性で標的分子に結合することから、抗体と同様、治療薬や診断薬として利用することが可能である。アプタマーは核酸であることから、DNA ポリメラーゼにより増幅されるが、アプタマーに標的分子が結合していると DNA ポリメラーゼによる増幅反応が阻害されることが想定される。つまり、このアプタマーを RPA で増幅し、その増幅効率を測定すれば標的分子を簡便に検出できると想定した。

そこで、本研究はモデル系としてトロンビンアプタマーを用い、RPA による DNA 増幅効率を指標にトロンビンを検出する方法を開発することを目

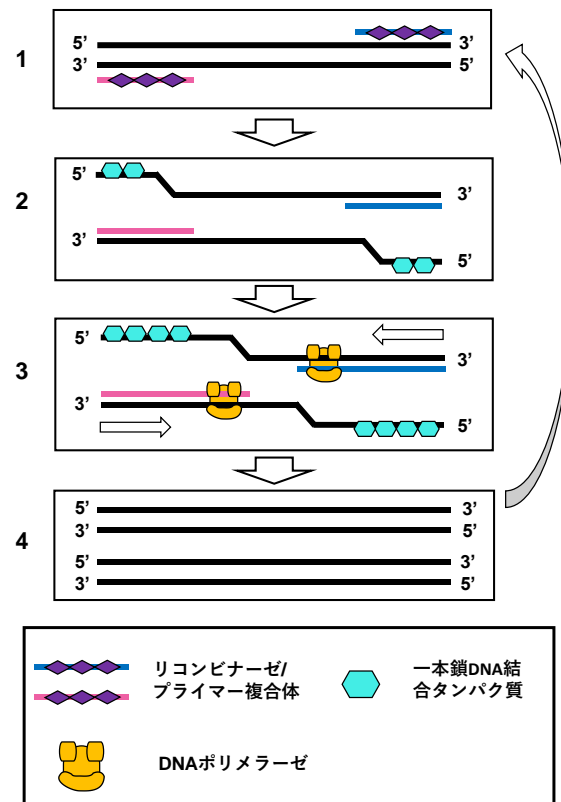


Fig. 1 RPA の増幅原理

標とした。トロンビンアプタマーはグアニン四重鎖 (G-quadruplex: G4) 構造を形成して、トロンビンに結合する。本研究室では RPA によって増幅される鋳型 DNA 中に G4 構造形成配列が存在すると、その G4 構造の安定性に依存して RPA が阻害されることを示している。そのため、トロンビンアプタマーを含む鋳型 DNA にトロンビンが結合すると RPA による増幅が阻害されると想定した (Fig. 2)。

つまり、RPA 増幅効率を測定するだけでトロニンビンを定量できると考えた。

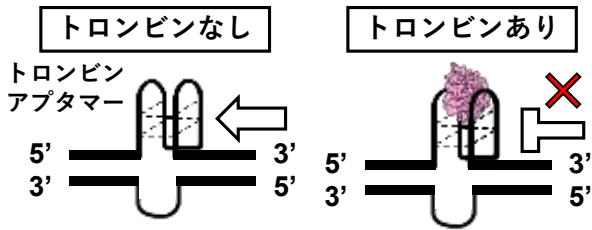


Fig. 2 RPA を用いたトロニン検出法の原理

2. 方法

130 mer のトロニンアプタマーを含む鋳型 DNA とプライマーを化学合成した。RPA 酵素溶液 (終濃度 200 μ M dNTP mix, 50 mM Sodium Creatine Phosphate Hydrate, 3 mM ATP, 2 mM DTT, 5% w/v PEG20000, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 14 mM $Mg(CH_3COO)_2$, 40000-fold diluted SYBR Green I, 500-fold diluted Rox Reference Dye, 67 ng/ μ L freeze-dried RPA pellets) を調製した。次に RPA 鋳型溶液 (1.0 \times 10⁸ copies/10 μ L 鋳型 DNA, 65 mM KCl, 120 nM プライマー, 1 μ M トロニン) を調製した。最後に、RPA 酵素溶液と RPA 鋳型溶液を混合し、39 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、20 秒ごとに SYBR Green I の蛍光強度を QuantStudio1 で測定した。

3 結果

トロニン存在下または非存在下におけるトロニンアプタマーを含む鋳型 DNA を RPA で増幅した結果、トロニン存在下では RPA の増幅効率が減少した (Fig. 3)。SYBR Green I の蛍光強度が 2.5 における Threshold time は、トロニン非存在下では 23.6 \pm 1.9 分であったのに対し、トロニン存在下では 26.6 \pm 0.8 分であった (Table)。つまり、トロニンアプタマーを含む鋳型 DNA の RPA 効率を測定するだけで、簡便にトロニンを測定できることが示された。

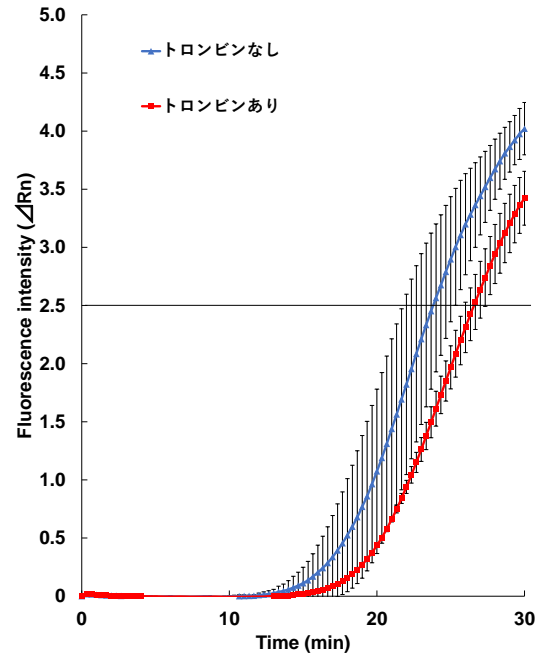


Fig. 3 鋳型 DNA の増幅曲線

Table トロニンの有無による Threshold time の変化

	Threshold time (分)	Δ Threshold time (分)
トロニンなし	23.6 \pm 1.9	
トロニンあり	26.6 \pm 0.8	3.0

4. 結論

トロニンアプタマーを含む鋳型 DNA の RPA 効率を測定した結果、トロニン存在下では RPA 効率が減少することが示された。つまり、トロニンがトロニンアプタマー部位に結合することにより、DNA ポリメラーゼの伸長反応が阻害されることが示唆された。本手法は使用するアプタマーを変更するだけで、その標的分子を RPA の増幅効率を指標に定量することが可能になる。つまり、種々のマーカー分子を同一のプラットフォームで定量することが可能になり、種々の疾病の簡易診断法への展開が期待できる。