

蛍光性 DNA プローブの合成と塩基欠失多型検出

【緒言】

デオキシリボヌクレオチド (DNA) は、遺伝情報の担い手であるだけでなく、相補鎖と自発的に二重鎖を形成する魅力的な超分子でもある。そのため DNA は、生物だけでなく化学あるいは物理・情報といった多岐に渡る分野で非常に精力的に研究されている。

もし、新たな機能を付与した DNA が合成できれば大きな波及効果が期待できる。近年では、医療や分子生物学への応用をターゲットとした研究のみならず、分子ワイヤーといった機能材料や DNA コンピューターのような情報デバイスなど生物学的な機能を超越した目的のためにも様々な人工 DNA の合成が行われている。生物学の分野において DNA の人工合成にはポリメラーゼを用いた PCR 法が用いられている。しかし、非天然分子を組み込んだ人工 DNA 配列を自在に合成可能なポリメラーゼは今のところ存在しておらず、人工 DNA の酵素的な合成は困難である。従って、多くの人工 DNA は化学的に合成される。DNA の化学合成においては、ホスホロアミダイト法を用いた固相合成が広く用いられている。A、G、C、T に対応するホスホロアミダイトモノマーと呼ばれるユニットをあらかじめ合成しておく、これを一残基ずつ DNA 合成機で固相担体上に伸長させる手法である。この手法を用いることで、極めて簡便に、任意の塩基配列を持つ DNA を選択的に合成することが可能となる。更に、DNA 中に組み込みたい分子のホスホロアミダイトモノマーを使用すれば、非天然分子を組み込んだ人工 DNA を合成することもできる。

本実験では、蛍光色素を組み込んだ人工 DNA の合成・精製と機能評価を通じて、DNA の化学合成法と蛍光発光について学ぶ。具体的には、蛍光色素 perylene (ペリレン) を導入した人工 DNA を化学的に合成することで、DNA の塩基配列を解析できる蛍光性プローブを調製し、その蛍光発光を観察することによって一塩基欠失の検出を行う。

完全に相補的な配列:

5'-GATTGCTTGATACC-3'

一塩基欠失を含む配列:

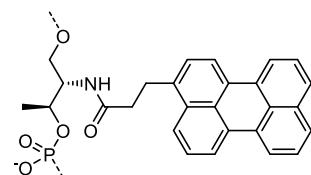
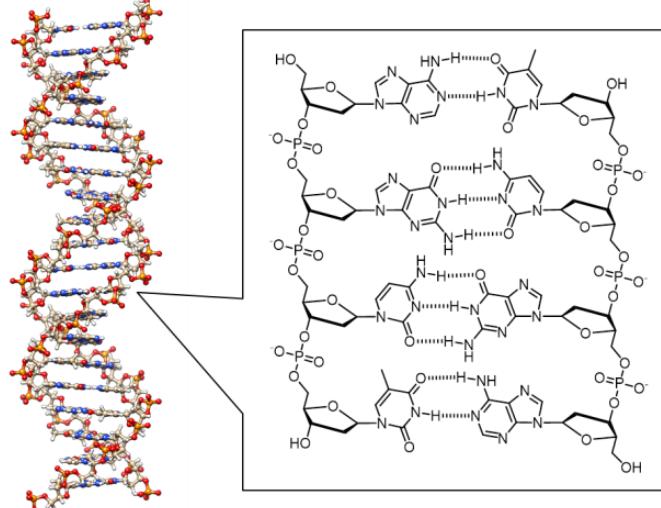
5'-GATTGC_GATACC-3'

合成する人工 DNA 配列 :

5'-GGTATCEAEGCAATC-3'

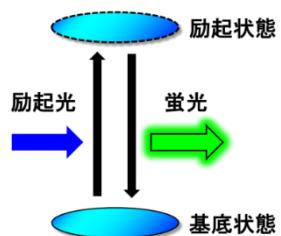
予備知識

遺伝子多型: ヒト DNA において、おおよそ 300,000 以上の遺伝子が多型を有している。多型としては、DNA 配列中の核酸塩基が別の核酸塩基へ置換する single nucleotide polymorphisms: SNPs や、塩基の欠失・挿入が起こる insertion/deletion polymorphisms: INDEL などが挙げられる。一部の多型は、個人の病気リスクや薬剤に対する感受性に大きく影響することが示唆されており、これら遺伝子多型の簡易検出が可能になればテーラーメイド医療の実現が期待できる。

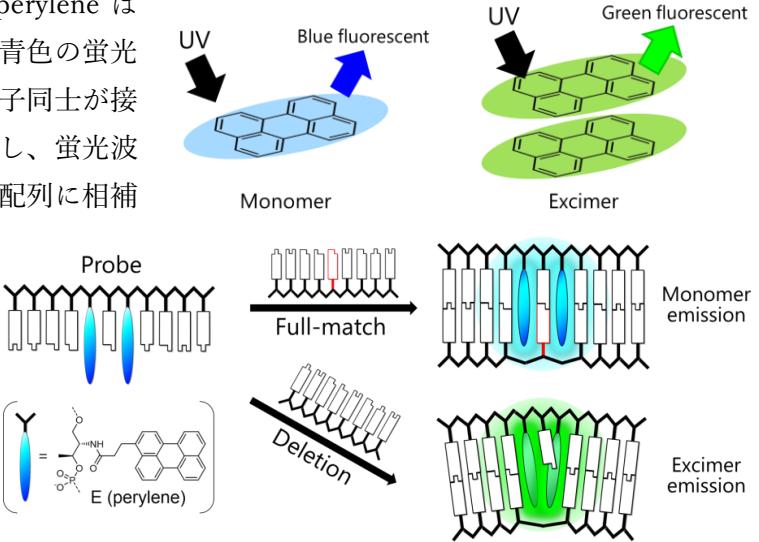


E (perylene)

蛍光発光: 分子が特定の波長の光を吸収することで励起状態へと遷移した後、基底状態に戻る過程で生じる発光現象の一つ。蛍光発光の波長や強度はその分子構造だけでなく、周辺環境にも依存する。蛍光発光する分子（蛍光色素）は限られており、生体試料などの中でも選択的かつ高感度な検出が可能であるため、生体物質の検出薬（プローブ）として汎用されている。



一塩基欠失検出 DNA プローブ: 蛍光色素 perylene は紫外-青色光(350 nm - 450 nm)で励起され、青色の蛍光発光を示す分子である。しかし、perylene 分子同士が接近すると excimer と呼ばれる複合体を形成し、蛍光波長が長波長側へとシフトする。従って、標的配列に相補的な DNA 配列を設計し、検出したい塩基の両側に perylene を導入することで一塩基欠失の検出プローブとなる。すなわち、検出対象が full-match の配列を持っていれば、プローブとの二重鎖形成により perylene が塩基対で隔てられモノマー状態で発光するのに対し、塩基が欠失している場合は perylene 同士の接触が起こり、蛍光色が変化するため配列の識別が可能である。（H. Kashida, T. Takatsu, H. Asanuma, *Tetrahedron Lett.* 2007, 48, 6759–6762.)



【日程】

- 1 日目：説明
- 2 日目：合成 DNA の簡易精製、HPLC 精製、PAGE 準備
- 3 日目：濃度決定、蛍光観察、PAGE 解析

【実験手順】

1. DNA 合成 →省略。

p. 6~8 参照

2. 切り出し・脱保護 →省略。

- 2-1. 乾燥させた CPG (5 mg) にアンモニア水 1mL 加え、しっかりと蓋をする。
- 2-2. 湯浴上 65 °Cで 60 min インキュベートする。
- 2-3. 常温にもどし蓋を開け、切り出し溶液に滅菌水 3 mL、2.0 M TEAA (triethylamine/acetic acid) 0.5 mL を加え混ぜる(簡易精製のための準備)。

-----二日目-----

3. 簡易精製（詳細は p.8）（通液操作は右図参照）

- 3-1. 簡易精製カラムに 4 mL のアセトニトリルを通液 （洗浄）
- 3-2. 4 mL の 2.0 M TEAA（トリエチルアミン・酢酸）を通液
(DNA が吸着されやすい状態にする)
- 3-3. DNA 切り出し溶液を通液 （DNA を吸着させる）
- 3-4. 純水を 6 mL 通液
(DMTr が結合していない不完全長 DNA を溶出する)
- 3-5. 2% TFA 水溶液を 2 mL 通液し 1 分静置、続けて 2% TFA 水溶液を
3 mL 通液し 1 分間静置 (DMTr 基の脱保護)
- 3-6. 純水 6 mL を通液 (TFA の洗浄)
- 3-7. 50% アセトニトリル水溶液 3 mL をゆっくり流し、色の付いた液(DNA)
のみを 1 mL 程度、マイクロチューブ(1.5 mL)に回収。



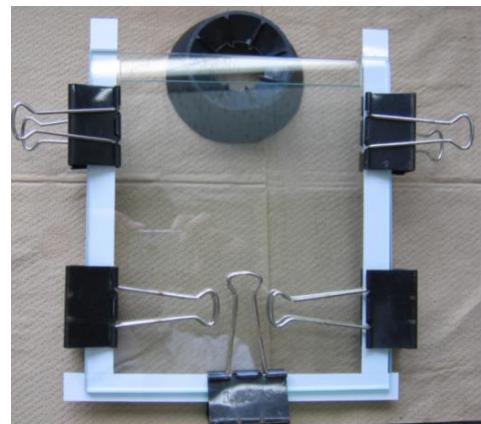
4. HPLC(高速液体クロマトグラフィー)精製

- 4-1. HPLC 装置を起動し、溶出条件を入力 (TA が行う)
- 4-2. 初期溶離液を流してカラムを平衡化する (TA が行う)
- 4-3. 3-7 で回収した DNA 溶液を専用の容器に移し、オートサンプラーにセットする
- 4-4. フラクションコレクターで目的ピークの溶出液を回収
- 4-5. 終夜乾燥 (TA が行う)

5. PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)準備

- 5-1. ゲル板・スペーサーとコームを水とメタノールでしっかりと拭き、右図のように組み立てる。
- 5-2. 20% アクリルアミドゲル溶液約 25 mL をプラスチック容器に取り、10% APS (過硫酸アンモニウム) を 150 μ L、10% TEMED (N,N,N',N' -テトラメチルエチレンジアミン) を 150 μ L 加え、振ってよく混ぜ、組み立てたゲル板の間に流し込む。その際、気泡が入らないよう注意する。

注意：アクリルアミドは神経毒であるため、肌に触れないように注意すること。万が一触れた場合はすぐに流水で洗い流し TA か教員に報告する。



- 5-3. 上部にコームを挿し、終夜放置しゲル化させる。

-----三日目-----

5-4. 下方のクリップ4つを外し、上部のコームと下部スペーサーを抜く。

(左右のスペーサーはそのままにしておく。)

5-5. 泳動装置を組み立て、下の容器にTBEバッファーを入れる。

5-6. ゲル板を泳動槽に設置し、ゲル板の隙間の空気を抜く。

5-7. 上の容器にもTBEバッファーを満たし、シリソジでウェルを洗い、15分程度プレラン(10W)をする。

注意：泳動中に溶液に触れると感電するので、絶対に触らない。



6. 濃度決定

6-1. 乾燥したDNAに滅菌水100μLを加え溶かす。

6-2. このDNA溶液の吸光度(260nm)をナノドロップ(吸光度測定機)で測定する。

6-3. DNA濃度を決定する。※ナノドロップで表示される値は光路長1cmとした値。

$$(\epsilon_{260} = 160,100 \text{ [M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{]} \quad (5'\text{-GGTATCEAEGCAATC-3'}))$$

7. 蛍光観察

7-1. 観察用溶液300μLを3種類調製する。

組成①：[合成DNA] = 5.0 μM、[標的DNA-A] = 5.0 μM、10 mM リン酸バッファー ([NaCl] = 200 mMを含む) の水溶液300μL

組成②：[合成DNA] = 5.0 μM、[標的DNA-B] = 5.0 μM、10 mM リン酸バッファー ([NaCl] = 200 mMを含む) の水溶液300μL

組成③：[合成DNA] = 5.0 μM、10 mM リン酸バッファー ([NaCl] = 200 mMを含む) の水溶液300μL
※DNA-AとDNA-Bはどちらかが完全に相補的な配列: 5'-GATTGCTGATACC-3'、もう一方が

一塩基欠失を含む配列: 5'-GATTGC_GATACC-3'である。

7-2. 室内光下及びUV(365nm/hand-held UV lamp)照射下において、色調を観察する。

注意：UVランプを直視しないこと。また、UVの反射光も長時間凝視してはならない。

以下の操作はPAGE開始(8-3)後行う。

7-3. サンプルを80°Cに温めた状態でUV照射下における色調を観察する。

7-4. それぞれのサンプルを測定容器に移し、蛍光スペクトルを測定する。USBにデータを保存する。

7-5. 観察用溶液100μLを別のマイクロチューブに移し、塩酸2滴加えた際の蛍光を観察する。

⇒レポートの結果に、各条件での蛍光色と輝度についてまとめ、なぜそうなったかを考察すること。

8. PAGE解析

8-1. 観察用溶液3種をそれぞれ別の容器に90μLずつ移す。

8-2. 10x Loading bufferを10μLずつ加え、ボルテックスで軽く混ぜる。

8-3. 再度ウェルを洗い、Loading bufferを加えた試料をアプライし、泳動を開始する。(10W, 30min)

8-4. ゲル板を泳動槽から取り外し、キムタオルで水分を拭き取る。

8-5. トランスイルミネーター(UV照射装置)でゲルを観察する。

【Materials】

・TBE バッファー(1 L):

トリス（ヒドリキシメチル）アミノメタン 5.4 g、ホウ酸 2.75 g、EDTA(2Na) 0.375 g

・20% ポリアクリルアミドゲル TBE 溶液 (1 L) :

アクリルアミド 194 g、メチレンビスアクリルアミド 6 g、グリセロール 70 mL in TBE バッファー

・10X リン酸バッファー:

2.0 M NaCl、100 mM リン酸バッファー pH 7.0

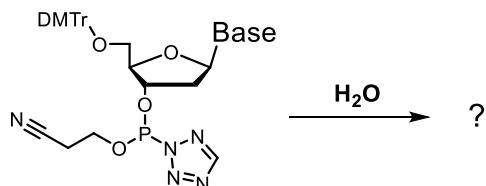
・標的 DNA 水溶液 (100 μ M)

完全に相補的な配列: 5'-GATTGCTGATACC-3'

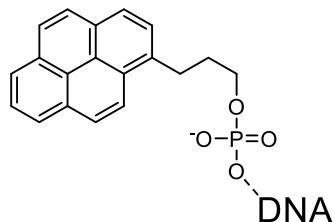
一塩基欠失を含む配列: 5'-GATTGCGATACC-3'

【レポート課題】 図を用いてもよい。

課題 1 : DNA 化学合成における伸長反応(Acivation と Coupling 反応)は脱水条件で行わなければならない。活性化モノマーと水分子との反応機構を巻き矢印で示し、生じる副反応産物の構造を予想して書け。



課題 2 : ホスホロアミダイト法でDNAを合成する際、5'末端に下図のような形でピレン（蛍光色素）を導入したい。どのようなモノマーを使用すればよいか。このピレンに対応するアミダイトモノマーの構造を示せ。



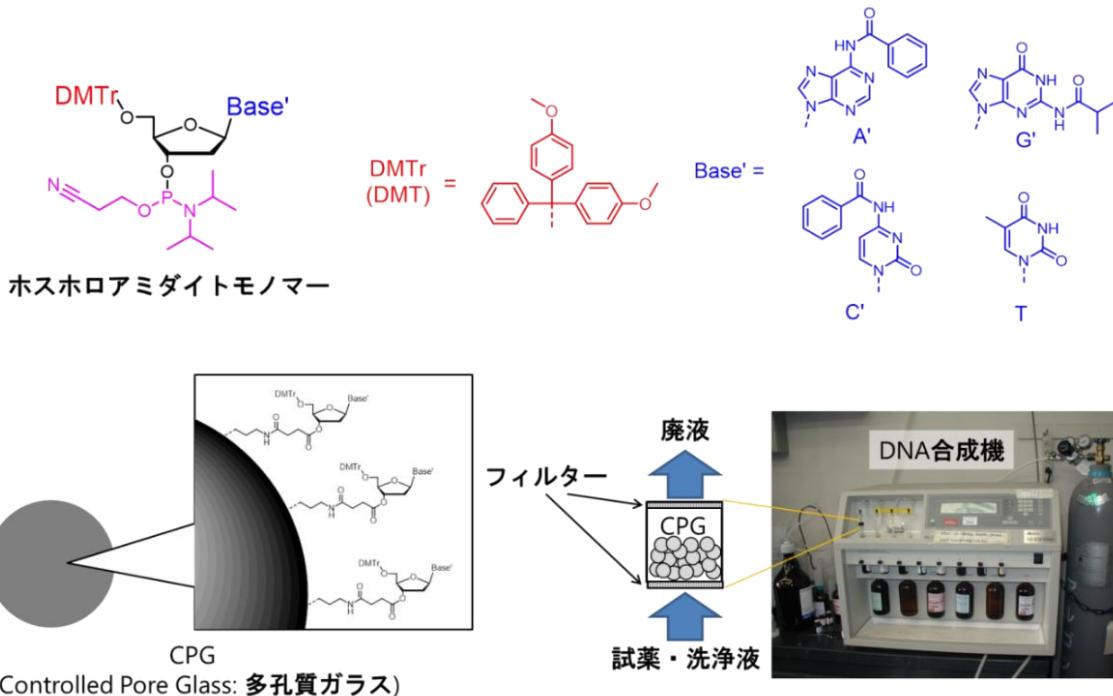
課題 3 : 蛍光性核酸検出プローブとして Molecular Beacon が広く利用されている。このプローブの検出原理を簡単に説明し、本実験で用いたプローブと比べた利点と欠点を述べよ。

課題 4 : 測定溶液には NaCl とリン酸バッファーが含まれている。これらそれぞれの役割を、DNA 二重鎖の安定性(T_m)の観点から考察せよ。

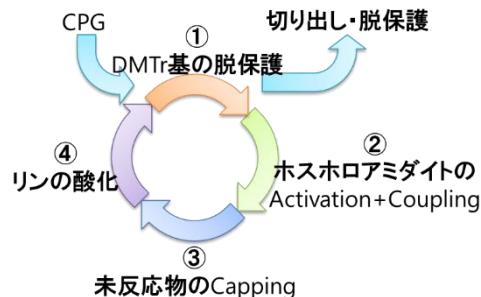
【各実験過程の解説】

(I) DNA 合成

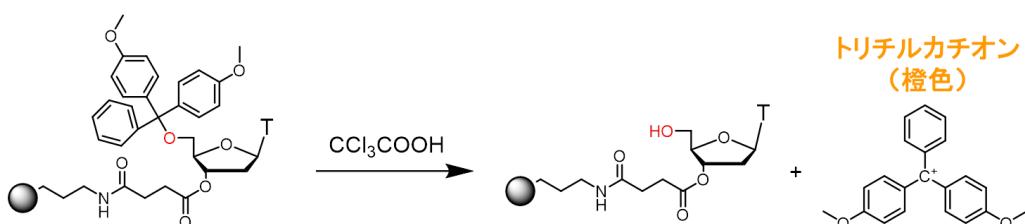
ホスホロアミダイト法を用いて DNA の固相合成を行う。本手法は、DNA の A, G, C, T に対応するホスホロアミダイトモノマーを固相担体(CPG)上に任意の順序で連結させ DNA を伸長させる手法であり、人工 DNA 合成に広く用いられている。基本的に合成は 3'→5' 方向で行う。3'末端の DNA モノマーと CPG はエステル結合を介して連結されているため、伸長後の DNA はエステル加水分解によって CPG から切り離すことができる。



CPG を合成用カラムに詰め合成機にセットし、合成したい配列を入力すると、試薬が順次通液され DNA 合成反応が進行する。未反応試薬は有機溶剤による洗浄で取り除くことができるため、液相合成に比べ非常に簡便である。具体的には①～④の反応サイクルを繰り返すことで目的の DNA 配列が合成される。以下に例として 5'-GCAT-3' を合成する場合の反応順序を示す。

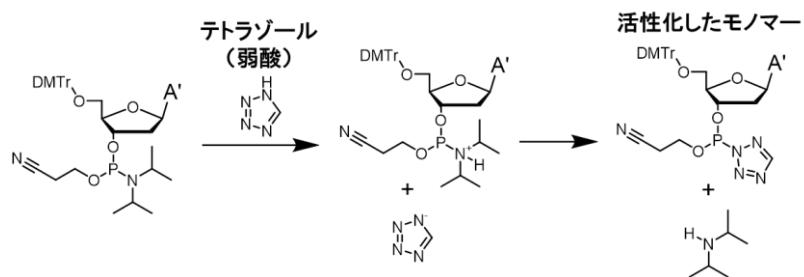


① DMTr 基の脱保護

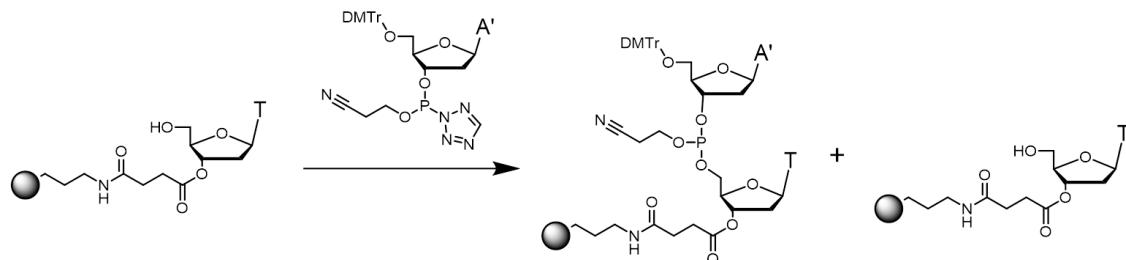


T モノマー(3'末端に対応するモノマー)が結合した CPG に酸を流すことで、DMTr 基を外す。これにより 5'水酸基が次のモノマーと反応できるようになる。脱離した DMTr 基は橙色を呈する。この廃液の吸光度から外れた DMTr の量を定量でき、Coupling の収率を概算することができる。

② ホスホロアミダイトモノマーの Activation と Coupling

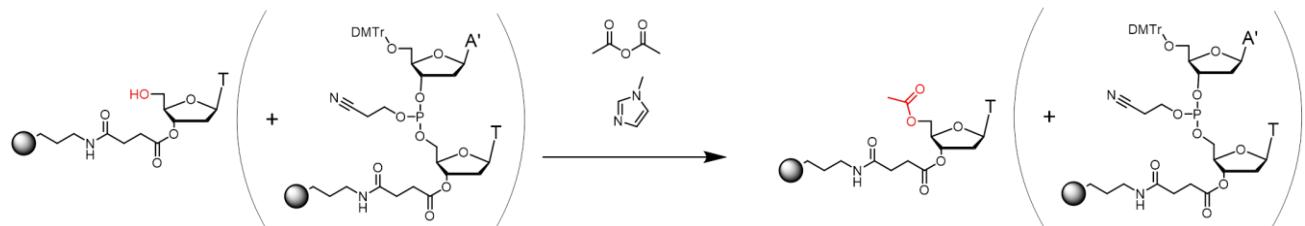


次に Coupling させるモノマーをテトラゾールで活性化させる。活性化したモノマーは失活しやすいため、Coupling 反応の直前に活性化を行う必要がある。



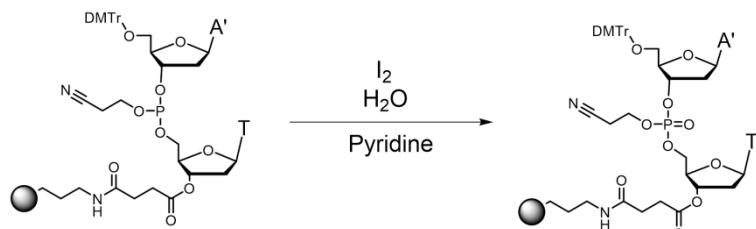
活性化したモノマーを通液し、CPG 上の T の 5' 水酸基と活性化モノマーを Coupling させる。

③ 未反応物の Capping

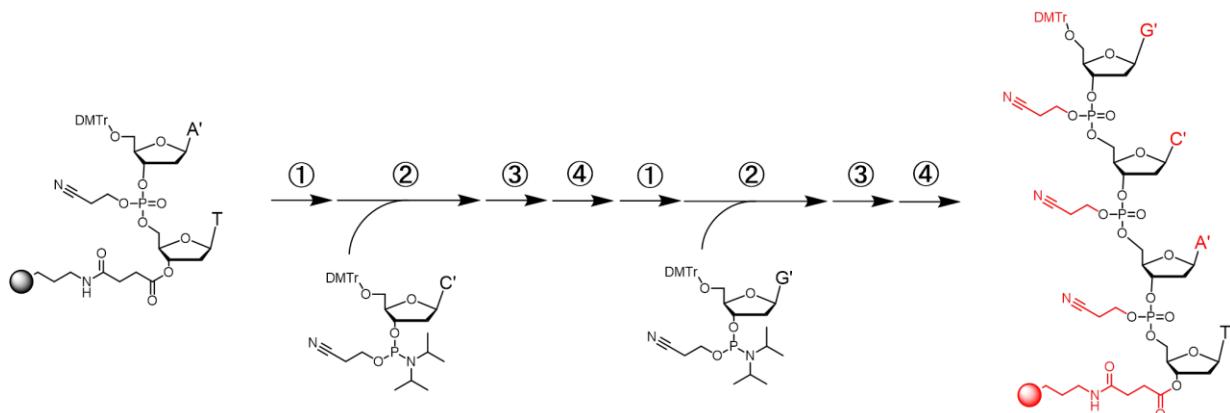


Coupling できなかった水酸基をアセチル化することで、副反応（塩基がスキップされた配列の生成）を防止する。（伸長が成功したものは反応に関与しない。）

④ リンの酸化



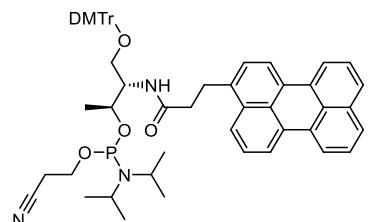
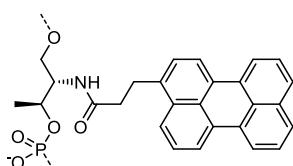
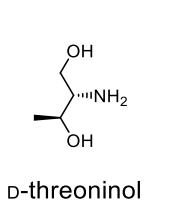
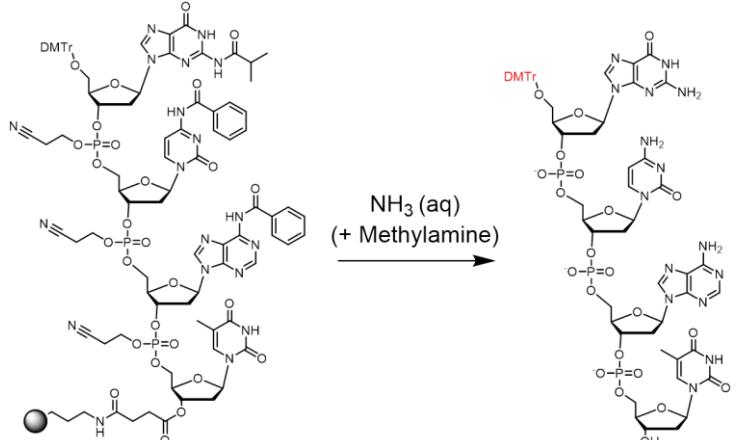
リンを 5 倍に酸化する。



①～④の反応サイクルを繰り返し、C、G を順に Coupling させる。以上のように、適切な順序で試薬を通液し反応させることによって、CPG 上に 5'-GCAT-3' の DNA 配列が選択的に伸長される。

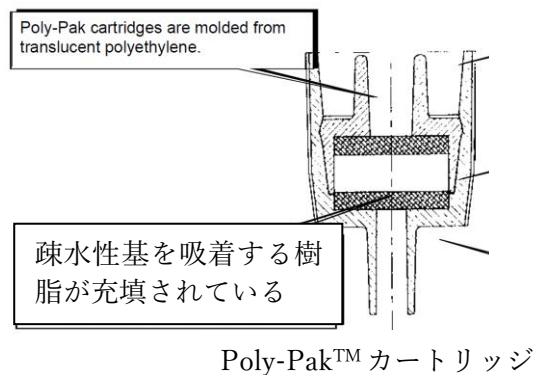
反応後の CPG を塩基性条件で処理することで、DNA が溶液中に切り出される。同時に、核酸塩基の保護基とシアノエチル基が脱保護される。なお、DMTr 基は簡易精製の段階で脱保護する。

本実験で実際に合成する配列は、5'-GGTATCEAEGCAATC-3' であり、E は perylene を示す。perylene は D-threoninol リンカーを介して DNA 中に導入する。そのため、DNA の A、G、C、T 四種のモノマーに加えて E に対応するアミダイトモノマーを用意する必要がある。



(II) 精製

(i) 疎水性基を吸着可能な樹脂 (Poly-Pak) を用いて簡易精製を行うことで、切り出し溶液から DNA を回収する。Poly-Pak に DNA(5'-DMTr 保護体)を含む切り出し溶液を通液すると、DMTr 基の疎水性によって DNA が樹脂に吸着される。途中で伸長が停止した鎖には DMTr が結合していないため吸着されにくく、目的の完全長 DNA との分離が可能である。吸着後、酸を通液することで DMTr 基を外し、アセトニトリル水



溶液を用いて目的の DNA 鎖を溶出させる。

(ii) 次に、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)精製により、簡易精製で除ききれなかった不純物や不完全配列を取り除く。逆相カラム(C18)に DNA 溶液を流し、疎水性の差によって完全長の DNA を回収する。260 nm と 450 nm の吸光度をモニターしながら目的のピークを分取し、乾燥させる。

(III) 濃度決定

固相合成は μmol スケールで行うため、得られた DNA を重量測定によって定量することは困難である。従って、DNA を含む水溶液の吸光度から濃度を決定する必要がある。DNA 配列及び E (perylene) の 260nm におけるモル吸光係数は既知であり、Lambert-Beer の法則を用いることで DNA 濃度を算出できる。本実験で用いる吸光度測定機の光路長は 0.1 cm である。

$$A = -\log_{10} \left(\frac{I_1}{I_0} \right) = \varepsilon cl$$

A: 吸光度
I₁: 透過光強度
I₀: 入射光強度
 ε : モル吸光係数
c: 濃度
l: 光路長

$$\varepsilon_{260} = 160,100 [\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}] \quad (5'\text{-GGTATCEAEGCAATC-3'})$$

(IV) INDEL の蛍光検出

perylene は紫外光で励起され、青色の蛍光発光を示す分子である。2 分子の perylene が接近すると excimer を形成し、蛍光色が長波長シフトし緑色へと変化する。この原理を応用することでハイブリダイゼーションを可視化でき、INDEL の識別が可能となる。今回合成した perylene 導入人工 DNA を標的となる相補鎖 DNA とハイブリダイズさせて、実際の色調・蛍光色の変化を目視及び蛍光スペクトル測定により観察する。相補鎖として、

完全に相補的な配列: 5'-GATTGCTTGATACC-3'

一塩基欠失を含む配列: 5'-GATTGC_GATACC-3'

の 2 種類を用いる。

次に、蛍光観察した溶液を PAGE(ポリアクリルアミドゲル電気泳動)にて解析する。ポリアクリルアミドゲル層の上部に DNA 溶液をアプライし、電圧をかけることでゲルの網目中を通してさせる。この際、分子の大きさに応じて移動度が変化する。泳動後のゲルをトランスイルミネーターで解析する。バンドの移動度や発光色について考察する。

