

Development of DNA Point Mutation Detection Methods Using Probe DNA-Immobilized Microbeads

Masahiko HASHIMOTO*, Yusuke TAMAI** and Kazuhiko TSUKAGOSHI***

(Received January 20, 2011)

One technique that can distinguish low-abundant mutant DNA from wild-type DNA is the ligase detection reaction (LDR) coupled to a primary polymerase chain reaction (PCR). The LDR products as a target obtained by the sequential PCR/LDR reactions can be analyzed in a variety of fashions such as microarray and slab gel electrophoresis. In the present work, we employed probe DNA-immobilized magnetic microbeads to selectively capture the fluorescently labeled-LDR products via the target hybridization with the probe. After the hybridization, the microbeads were rinsed and introduced into a capillary tube and packed in one space in the tube with a magnet. Photoluminescence from the beads aggregates in the tube was successfully obtained with fluorescence or chemiluminescence detection system, showing that the present method can be amenable to mutation detection.

Key words: ligase detection reaction (LDR), DNA mutation, microbeads, hybridization

キーワード: リガーゼ検出反応, DNA 変異, 微粒子, ハイブリダイゼーション

DNA プローブ固定化微粒子を用いた DNA 一塩基変異検出法の開発

橋本 雅彦, 玉井 祐介, 塚越 一彦

1. はじめに

ras 遺伝子は、発癌ウイルスに誘導される悪性腫瘍の因子となる遺伝子として最初に同定された癌遺伝子で、*ras* 遺伝子群(*H-ras*, *K-ras*, *N-ras*, *R-ras*)を構成している。元来 *ras* 遺伝子は発癌活性を持たないものの、遺伝子に突然変異が生じると発癌活性をもつようになり、該変異を有する細胞が形質転換されることが知られている。*ras* 遺伝子群の一つの *K-ras* 遺伝子は、ヒト第 12 番染色体の短腕上に位

置しており、その活性化型変異体(*K-ras* 癌遺伝子)は、ヒトの癌において最も多く見出される癌遺伝子の一つである。これらの癌において、*K-ras* 癌遺伝子からの変異型 *K-ras* タンパク質の持続的発現・生成が、細胞の癌化および癌細胞としての形質維持に不可欠となっている。大腸癌において、癌発達初期には約 30—50%の大腸癌患者の *K-ras* 遺伝子に点突然変異が存在することが知られている¹⁻⁵⁾。それゆえ、*K-ras* 遺伝子において点突然変異を確認

* Department of Chemical Engineering and Materials Science, Doshisha University, Kyoto
Telephone:+81-774-65-6594, Fax:+81-774-65-6803, E-mail: mahashim@mail. doshisha. ac. jp

** Former undergraduate student of Doshisha University

*** Department of Chemical Engineering and Materials Science, Doshisha University, Kyoto
Telephone:+81-774-65-6595, Fax:+81-774-65-6803, E-mail: ktsukago@mail. doshisha. ac. jp

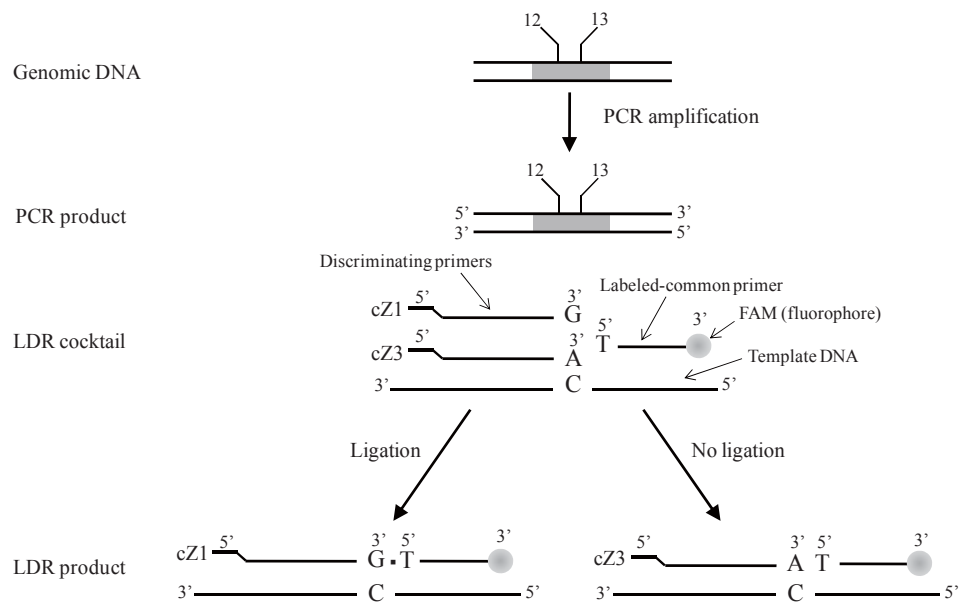


Fig. 1. Conceptual schematic of the PCR/LDR assay.

することは、癌疾病の管理に非常に有効である。

ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction; PCR)は、DNA ポリメラーゼを用い、ターゲットシーケンスのコピーを増幅させる方法であり⁶⁾、ごく少量の DNA でさえ指数関数的に増幅させることができるため、感染症・遺伝性疾患の診断法として広く利用されている。

正常型 DNA と変異型 DNA とを識別する手法の 1 つとして、リガーゼ検出反応 (Ligase Detection Reaction; LDR) が挙げられる。変異サイトを含むシーケンスのコピーを PCR により増幅した後、LDR を適用して変異を検出する PCR/LDR アッセイ⁷⁻¹¹⁾の概略図を Fig. 1 に示す。LDR 反応液は、2 種の LDR プライマー (識別プライマーおよび共通プライマー)、テンプレート DNA (PCR プロダクト) および DNA リガーゼで構成される。まず、加熱によりテンプレート DNA を 1 本鎖 DNA へと熱変性させ、その後、適切な温度まで冷却し、LDR プライマーをテンプレートシーケンスにアニールさせる。テンプレート DNA 上の変異した塩基に対し相補的な塩基を 3' 末端に持つ識別プライマーは、DNA リガーゼの働きにより共通プライマーの 5' 末端とライゲートされた DNA 断片 (LDR プロダ

クト) となる。共通プライマーをあらかじめ蛍光ラベル化しておけば、LDR プロダクトからは蛍光が確認される。識別プライマーの 3' 末端の塩基が、テンプレートの変異した塩基と相補的ではない場合には、両プライマーはライゲートされず LDR プロダクトは生成しない。

LDR 後は、得られた LDR プロダクトを選択的に検出することで変異の有無を確認することができる。本研究では、3' 末端の塩基が異なる 4 種の識別プライマーを用いて LDR を行い、LDR 反応後の溶液を、それぞれの識別プライマーの 5' 末端側の 24 塩基と相補的なシーケンスを有する 4 種のプローブ DNA に加え、LDR プロダクトをプローブ DNA へハイブリダイズさせた。また、本研究ではプローブ DNA の担体として取り扱いが簡便な機能性磁性微粒子を用いた。本手法では LDR プロダクトが捕捉されたプローブ DNA 固定化微粒子からのみ蛍光シグナルが得られ、点突然変異を確認することが可能となる。本研究では、蛍光法や化学発光法を適用し、微粒子からの光シグナルをモニタリングすることで点突然変異の識別を試みた。

2. 試薬および実験方法

Table 1. Sequences of the oligonucleotides used in the present study

primer	sequences (5'→3')	size (mer)
PCR forward	TTAAAAGGTACTGGTGGAGTATTTGATA	28
PCR reverse	AAAATGGTCAGAGAAACCTTATCTGT	27
44-stem loop G 12 Wt	GGGCACTCTTGCCACGCCACCAGCTCCAACCTACCACAAGTTTT	44
K-ras c12 Com-2	^a pTGGCGTAGGCAAGAGTGCCT- ^b FAM	20
cZip1-K-ras c12.2 Wt G	GCTGAGGTCGATGCTGAGGTCGCAAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG	47
cZip3-K-ras c12.2 D	GCTGCGATCGATGGTCAGGTGCTGAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGA	47
cZip5-K-ras c12.2 A	GCTGTACCCGATCGCAAGGTGGTCAAACCTTGTGGTAGTTGGAGCTGC	47
cZip11-K-ras c12.2 V	CGCAAGGTAGGTGCTGTACCCGCAAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGT	47
zip code 1	^c TGCGACCTCAGCATCGACCTCAGC-biotin	24
zip code 3	^c CAGCACCTGACCATCGATCGCAGC-biotin	24
zip code 5	^c GACCACCTTGGATCGGGTACAGC-biotin	24
zip code 11	^c TGCGGGTACAGCACCTACCTTGTG-biotin	24
67-mer Zip 11 com/3FAM	GCTGAGGTCGATGCTGAGGTCGCAAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG- TGGCGTAGGCAAGAGTGCCT-^bFAM	67

^ap, phosphorylated.

^bFAM, $\lambda_{ex} = 495$ nm; $\lambda_{em} = 520$ nm.

^cThe bodface sequences are complementary to those of the zip code probes.

2. 1 試薬

本研究に用いた試薬は、全て市販の特級品である。反応溶液の調製には、nuclease-free water (Promega) を用い、それ以外の用途では純水製造装置 (Elix 3 UV, MILLIPORE) で精製された RO 水を用いた。オリゴヌクレオチドの合成は、Invitrogen, Integrated DNA Technologies (IDT) あるいは Sigma Genosys に依頼した。本研究で用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列を Table 1 に示す。ストレプトアビジンが表面にコートされた磁性微粒子 (粒径 1–3 μ m) は、Chemagen より購入した。

2. 2 実験方法

2. 2. 1 LDR

通常、LDR では点突然変異したサイトを含む領域を PCR により増幅させテンプレート DNA とするが、本研究では基礎検討として 44-mer の合成オリゴ DNA をテンプレート DNA (44-stem loop G 12Wt in Table 1) として用いた。Nuclease-free water, 1x Reaction バッファ, 100 mM KCl, 100 nM 識別プライマー (cZip1-K-ras c12.2 WtG, cZip3-K-ras c12.2 D, cZip5-K-ras c12.2 A and cZip11-K-ras c12.2 V in Table 1), 3'末端をフルオレセイン(FAM)で蛍光ラベル化した 100 nM 共通プライマー (K-ras c12 Com-2 in Table 1), 100 nM テンプレート DNA および 0.4 units/ μ l Taq DNA リガーゼを 200 μ l のマイク

ロチューブに加えた。反応溶液の全量は 100 μ l とし、Master cycler を用いて反応を行った。まず、反応溶液を 94 $^{\circ}$ C で 2 分間加熱し、次に 94 $^{\circ}$ C で 30 秒間、65 $^{\circ}$ C で 2 分間保持する温度サイクルを 50 回繰り返し、最後に 4 $^{\circ}$ C に冷却した。

2. 2. 2 プローブ DNA の磁性微粒子への固定化

プローブ DNA (zip codes 1, 3, 5 and 11 in Table 1) には、3'末端にビオチンが修飾されたものを用い、磁性微粒子にはストレプトアビジンが表面に修飾されているものを用いた。ストレプトアビジンとビオチンとの特異的相互作用を利用し、プローブ DNA の磁性微粒子への固定化を行った。

まず、10 μ l の 25 mg/mL ストック微粒子懸濁液をボルテックスミキサーにかけ、200 μ l のマイクロチューブに移し、ネオジウム磁石を用いてストック懸濁液中の磁性微粒子のみをチューブ底に集め、磁性微粒子を吸入しないように注意しながら上澄み液を取り除いた。次に、Binding バッファとしての 10x SSC バッファを 20 μ l 入れて攪拌し、同様に磁性微粒子のみをチューブ底に集め、上澄み液を取り除いた。この操作を 2 回行った。最後に、10x SSC バッファを 40 μ l 加えて再懸濁させた。この溶液に、20 μ M のプローブ DNA を 50 μ l 加え、小型ローテーター (EYELACO) で攪拌しながら室温で 30 分間インキュベートした。ネオジウム磁石を用いて、

DNA を固定化した磁性微粒子を回収し、溶媒を取り除いた後、200 μ l の 10x SSC バッファで3回洗浄した。その後、再び200 μ l の 10x SSC バッファで再懸濁させ、ハイブリダイゼーション実験を行うまで保存した。

2. 2. 3 ハイブリダイゼーション分析

LDR 反応後の溶液を、2. 2. 2 に記した手順で調製したプローブ固定化微粒子懸濁液に懸濁液最終濃度が 0.5 mg/ml となるように加えた後、ハイブリダイゼーションオープンに移し、55 $^{\circ}$ C で2時間インキュベートした。ハイブリダイゼーション後は、溶媒を取り除き、微粒子を 40 μ l の 10x SSC バッファ中に懸濁させ、ハイブリダイゼーションオープンを用いて 55 $^{\circ}$ C で20分間攪拌したのち溶媒を取り除いた。この洗浄操作を3回繰り返した。次に、懸濁液を空のキャピラリー内に落差法で流し込み、磁石を用いてキャピラリーの検出窓に微粒子を集積させた。

プローブに捕捉された LDR プロダクトを検出するために、蛍光検出あるいは化学発光検出を適用した。蛍光検出にはレーザー励起蛍光スキャナー (FLA-8000, Fuji Film) あるいは落射型顕微鏡 (IX71, Olympus) -EMCCD カメラ (iXon^{EM+}, Andor) システムを用いた。一方、化学発光検出を行う場合は、微粒子が充填されたキャピラリーの検出窓をブラックボックス内の光電子増倍管(PMT)の前面に設置し、アセトニトリルを溶媒として調製した化学発光試薬 (2 mM TDPO-100 mM H₂O₂ 混合液) を落差法によりキャピラリー内に送液し、発光シグナルの検出を行った。

3. 結果および考察

3. 1 ハイブリダイゼーションの忠実性の検証

磁性微粒子に固定化されているプローブ DNA の塩基配列に対して相補的な塩基配列を 5'側にもつ識別プライマーが、プローブ DNA にハイブリダイズする。LDR プロダクトが生成すれば、その 3'末端には FAM が標識されているので、LDR プロダクトがハイブリダイズしたプローブ固定化微粒子からは光シグナルが確認されることが期待される。一

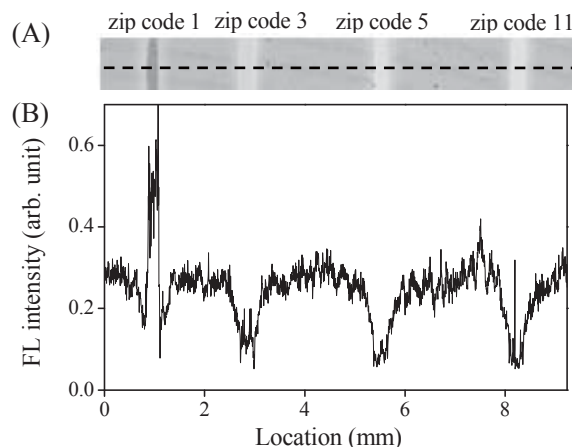


Fig. 2. Fluorescence from the beads bed in capillaries. (A) Scanned image, (B) fluorescence was integrated over the indicated line in (A).

方、テンプレート DNA の変異サイトの塩基に対して相補的でない塩基を 3'末端にもつ識別プライマーを用いた場合には、LDR 反応によりプロダクトは生成しないので、ハイブリダイゼーションを行ってもシグナルは確認されないと考えられる。これを検証するための基礎検討として、Table 1 に示した4種類のプローブ DNA (zip codes 1, 3, 5 and 11) がそれぞれ固定化された微粒子および zip code 1 に相補的であり 3'末端が FAM で標識された合成モデル LDR プロダクト (67-mer Zip 1 com/3FAM) を用いてハイブリダイゼーション実験を行い、各微粒子集団からの蛍光を比較した。

それぞれの zip code プローブを固定化した微粒子群を 2. 2. 3 に記した手順で個別のキャピラリーに各々充填し、キャピラリーの検出窓付近を FLA-8000 によりレーザー蛍光スキャンした結果を Fig. 2(A)に示す。さらに、Fig. 2(A)に示したライン上の蛍光強度を解析した結果を Fig. 2(B)に示す。Fig. 2の結果に示されている通り、zip code 1 が固定化された微粒子を充填したキャピラリーからのみ蛍光シグナルが観測され、ハイブリダイゼーションの忠実性を確認することができた。

3. 2 ハイブリダイゼーション・アッセイ

Table 1 に示した 44-mer のオリゴヌクレオチド

(44-stem loopG 12 Wt) をテンプレート DNA とし

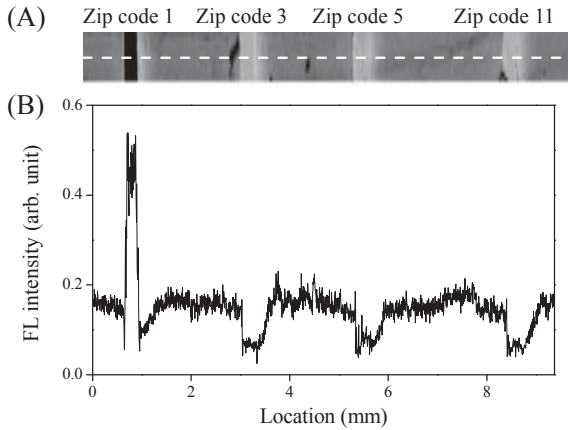


Fig. 3. Images for beads-loaded capillaries by the microscope-EMCCD camera detection system. (A) Bright field image, (B) fluorescence image.

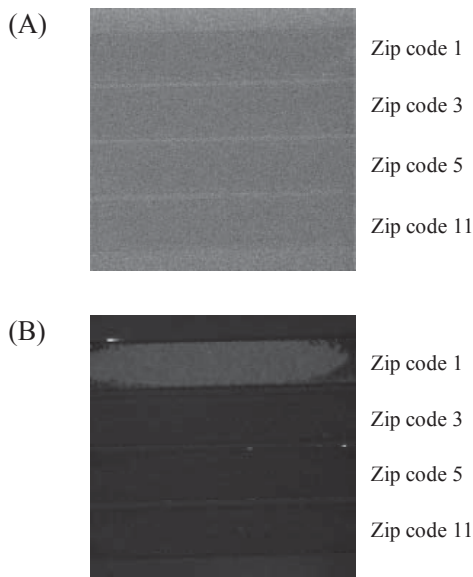


Fig. 4. Images for beads-loaded capillaries by the microscope-EMCCD camera detection system. (A) Bright field image, (B) fluorescence image.

て LDR を行った. このテンプレート DNA シークエンス中の着目塩基 (C) は, 識別プライマー cZip-K-ras c12.2 WtG の 3'末端の塩基 (G) と相補的である. また, この識別プライマーは, zip code 1 と相補的なシーケンスを有する.したがって, zip code 1 が固定化された微粒子からのみ光シグナルが得られることが推測される.

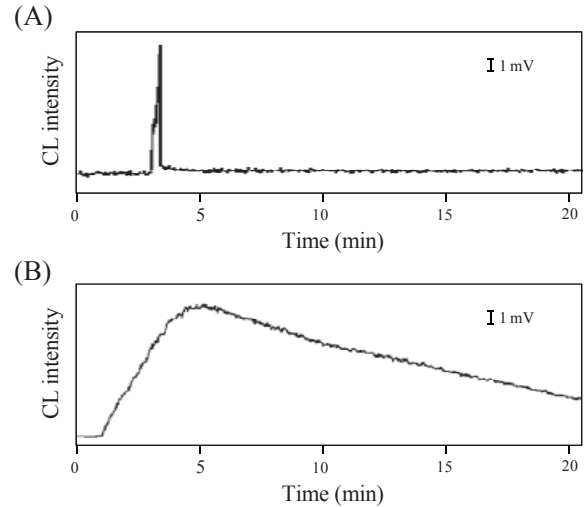


Fig. 5. CL profiles for the blank (A) and zip code 1-immobilized beads (B).

LDR 反応後の溶液を用いてハイブリダイゼーションを行ったのち微粒子を洗浄し, 3. 1と同様にキャピラリーの検出窓付近に集積させた微粒子集団をレーザー蛍光スキャンしたものを Fig. 3(A)に示す. Fig. 3(A)に示したライン上の蛍光強度を解析した結果を Fig. 3(B)に示す. また, 同じ 4本のキャピラリーを落射蛍光顕微鏡システムを用いて明視野で観察したイメージを Fig. 4(A), プローブ固定化微粒子から発せられる蛍光をとらえたイメージを Fig. 4(B)に示す. いずれの蛍光検出システムでも, LDR プロダクトに相補的なシーケンスを持つ zip code 1 が固定化された微粒子を充填したキャピラリーからのみ蛍光が確認された.

次に同様のサンプルを化学発光検出することを試みた. 化学発光試薬を空のキャピラリー内に流した際に検出された発光プロファイルを Fig. 5(A)に, 一方, Figs. 3, 4の実験において蛍光が得られたキャピラリー内に化学発光試薬を流したときに検出された発光プロファイルを Fig. 5(B)に示す. (A)では, 3分過ぎにピークが現れたが, これは発光試薬自体の光シグナルであると考えられる. 一方, (B)では1分過ぎから発光シグナルが現れ始め, 5分に最大発光強度に達し, その後発光が10分以上持続した. (B)では LDR プロダクトにタグされた

FAM から化学発光が得られていると考えられる。化学発光検出を適用した場合は、蛍光検出を適用したときよりも 1桁高い S/N 比が得られ、光源を必要としないその高い検出感度が示された。

4. 結論

本研究では、DNA 点突然変異の検出を指向した LDR/Hybridization アッセイにおいて、プローブ DNA となる zip code DNA をストレプトアビジンが表面にコートされた磁性微粒子に固定化し、ターゲット DNA のハイブリダイゼーション実験を行った。微粒子表面でのハイブリダイゼーションの後、微粒子を洗浄し、キャピラリーの検出窓付近に磁石で微粒子を集積化させ、蛍光および化学発光により検出を試みた。調製した LDR プロダクトに相補的なシークエンスを持つ zip code 1 が固定化された微粒子からのみ蛍光あるいは化学発光シグナルを検出することができ、本手法が DNA 点突然変異の検出に適用可能であることが示された。

本研究の一部は、「理工学研究所 2009 年度同志社大学理工学研究所研究助成金（個人）」、文部科学省（MEXT）私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「先進微粒子材料の科学と工学の融合」、文部科学省科学研究費補助金若手研究（B）「癌遺伝子診断マイクロ流体デバイスの開発」、科学技術振興機構研究成果最適展開支援事業「コロイドが拓く次世代型の遺伝子変異解析技」の支援を受けた。ここに記して、謝意を表する。

参考文献

- 1) C. B. Rothschild, C. S. Brewer, B. Loggie, G. A. Beard and M. X. Triscott, "Detection of colorectal cancer K-ras mutations using a simplified oligonucleotide ligation assay", *J. Immunol. Methods*, **206**, 11-19 (1997).
- 2) K. Otori, Y. Oda, K. Sugiyama, T. Hasebe, K. Mukai, T. Fujii, H. Tajiri, S. Yoshida, S. Fukushima and H. Esumi, "High frequency of K-ras mutations in human colorectal hyperplastic polyps", *Gut*, **40**, 660-663 (1997).
- 3) P. Anker, F. Lefort, V. Vasioukhin, J. Lyautey, C. Lederrey, X. Q. Chen, M. Stroun, H. E. Mulcahy and M. J. Farthing, "K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer", *Gastroenterology*, **112**, 1114-20 (1997).
- 4) J. M. Chiang, "Role of K-ras mutations in colorectal carcinoma", *Cancer Lett.*, **126**, 179-185 (1998).
- 5) S. N. Andersen, T. Løvig, J. Breivik, E. Lund, G. Gaudernack, G. I. Meling, T. O. Rognum, "K-ras mutations and prognosis in large-bowel carcinomas", *Scand J Gastroenterol.* **32**, 62-69 (1997).
- 6) K. B. Mullis and F. A. Faloon, "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction", *Methods. Enzymol.*, **155**, 335-350 (1987).
- 7) F. Barany, "Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase", *PNAS*, **88**, 189-193 (1991).
- 8) R. A. Favis, J. P. A. Day, N. P. A. Gerry, C. B. Phelan, S. B. Narod and F. Barany, "Universal DNA array detection of small insertions and deletions in BRCA1 and BRCA2", *Nature Biotechnol.*, **18**, 561-564 (2000).
- 9) M. Hashimoto, M. L. Hupert, M. C. Murphy and S. A. Soper, "Ligase detection reaction/hybridization assays using three-dimensional microfluidic networks for the detection of low-abundant DNA point mutations", *Anal. Chem.*, **77**, 3243-3255 (2005).
- 10) M. Khanna, P. Park, M. Zirvi, W. Cao, A. Picon, J. Day, P. Paty and F. Barany, "Multiplex PCR/LDR for detection of K-ras mutations in primary colon tumors", *Oncogene*, **18**, 27-38 (1999).
- 11) N. P. Gerry, N. E. Witowski, J. Day, R. P. Hammer, G. Barany and F. Barany, "Universal DNA microarray method for multiplex detection of low abundance point mutations", *J. Mol. Bio.*, **292**, 251-262 (1999).