

## APPLICATION SHEET

### 『表面プラズモン共鳴センサによる一塩基多型の判定』

九州計測器株式会社 ケミカルセンシンググループ

[http://www.qk-net.co.jp/RANA\\_Site/top-r.html](http://www.qk-net.co.jp/RANA_Site/top-r.html)

【本社】福岡県福岡市博多区山王一丁目 6-18

TEL:092-441-3200 FAX:092-441-3264

#### 1. はじめに

一塩基多型 (SNP) は生物の個体差に関与しており、その判定への需要も多い。ここではがんペプチドワクチンの適格性に関連があると報告されている<sup>1)</sup> ハプトグロビンのプロモータ領域の SNP (rs5471) について、表面プラズモン共鳴センサを用いた判定例を紹介する。この SNP を判定するために 2 種類の多型 (A 型及び G 型) およびコントロール用として実際には存在しない T 型の 3 種類の多型遺伝子鎖に対する相補鎖を同じチップの異なるチャンネルにリガンドとしてそれぞれ固定化した。投入するサンプルは被験者のゲノムをテンプレートとして非対称 PCR 法<sup>2)</sup> により当該 SNP 部を含む 90 mer の 1 本鎖 DNA 増幅物を調製し、これを用いた。なお判定の際にはリガンドと 1 本鎖 DNA 増幅物との特異的な結合を増強するため Hybridization Enhancement Blocker (HEB)<sup>3)</sup> を添加する必要がある。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 試薬など

- NHS : 115 mg の N-hydroxysuccinimide を 10 mL の蒸留水で溶解する。要時調製。
- ECD : 750 mg の N-ethyl-N'- (3-dimethylaminopropyl) cabodiimide hydrochloride を 10 mL の蒸留水で溶解する。要時調製。
- Ethanolamine : ethanolamine hydrochloride を NaOH で pH 8.5 に調整し、蒸留水でフィルアップし濃度を 1 M にしたもの。
- Buffer A : 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.005% Tween20
- Buffer B : 10 mM 酢酸 buffer, pH 5.0
- Buffer C : 10 mM Hepes, 1000 mM NaCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.005% Tween20
- 判定用リガンド : 3 '側にビオチンを修飾した下記の 3 種類を用いた。SNP への相補部分を赤字で、スペーサー部分を青字で示した。

A sensor : 5'-CCCCT**GT**TCCA-**AAA**-Biotin

G sensor : 5'-CCCCT**CG**TCCA-**AAA**-Biotin

Control sensor : 5'-CCCCT**AG**TCCA-**AAA**-Biotin

- 1stPrimerLeft : 5'AGATGGCCACACACAAGGTG

- 1stPrimerRight : 5'CCACGGGAGCTGATGACATA
- 2ndPrimerLeft : 5'CCAGGGCCAAAGTTTGTAGA
- 2ndPrimerRight : 5'GGGCATCTGCTGGTCTTTTT
- Left HEB : 5'CGTAATTCCTGTGTCTACAA
- Right HEB : 5'TTATGCTGCCACTAGCTCAC

## 2.2 センサ表面の作製

### 2.2.1 センサチップの洗浄と自己組織化単分子膜の形成

- ①チップをイソプロピルアルコール (5 min)、メタノール (5 min) の順に超音波洗浄し、蒸留水でリンスして乾燥。
- ②PDMS を 1.35 M HCl で 5 min 超音波洗浄し、蒸留水でリンスして乾燥。
- ③自己組織化単分子膜形成用 PDMS をチップに装着しエタノールに溶解した 1 mM 7-carboxy-1-heptanethiol (同仁化学研究所) を投入し、密封して室温でオーバーナイト。
- ④チップを蒸留水でリンスして、エタノールに浸漬して 30 s 超音波洗浄し、蒸留水でリンスして乾燥。

### 2.2.2 チップ表面へのアビジンおよびリガンドの固定化

- ①チップに 5ch フローセル (PDMS 製) と 5ch インジェクションプレートをセットし、各チャンネルに Buffer A を 20  $\mu$ L インジェクトし、センサグラムが安定するまで待つ。以後必要に応じてインジェクションプレートの液溜の溶液を取り除くこと。
- ②NHS と ECD を等量混合したものをすべての ch にそれぞれ 20  $\mu$ L インジェクトして 10min 保持。
- ③20  $\mu$ L の Buffer A をインジェクト。
- ④Buffer B に溶解した 50  $\mu$ g/mL のアビジン溶液を 20  $\mu$ L インジェクトし、30min 保持。
- ⑤20  $\mu$ L の Buffer A をインジェクト。
- ⑥20  $\mu$ L の Ethanolamine をインジェクト。10min 保持。
- ⑦20  $\mu$ L の Buffer A をインジェクト。10min 保持。
- ⑧Buffer A で希釈した 1  $\mu$ M の A sensor, G sensor, Control sensor をそれぞれ ch2, 3, 4 に各 20  $\mu$ L インジェクトして 30 min 保持。
- ⑨10 mM NaOH 20  $\mu$ L をインジェクトし、続いて 20  $\mu$ L の Buffer A をインジェクト。これを 3 回繰り返す。
- ⑩チップを取り外し、蒸留水で洗浄して乾燥し保存しておく。

## 2.3 当該 SNP 部の 1 本鎖 DNA サンプルの調製

- ①Gentra Puregene Buccal Cell Kit (キアゲン) を用いて口腔粘膜細胞からゲノムを抽出。

- ②これをテンプレートとし通常の PCR 法で当該 SNP 部を含む 763 bp の増幅物を作成した。  
(反応チューブに Premix Ex Taq (タカラバイオ) 10  $\mu$  L、1stPrimerLeft と 1stPrimerRight をそれぞれ終濃度 1  $\mu$  M、テンプレート 4  $\mu$  L を加え、滅菌水で 20  $\mu$  L にフィルアップ。95°C5min $\rightarrow$ (94°C30s $\rightarrow$ 57°C30s $\rightarrow$ 72°C60s)  $\times$  35 cycle $\rightarrow$ 72°C3min)
- ③増幅物を 10<sup>5</sup> 倍に希釈しこれをテンプレートとして非対称 PCR 法で当該 SNP 部を含む 90 mer の 1 本鎖 DNA 増幅物 60  $\mu$  L を作成した。(反応チューブに Premix Ex Taq (タカラバイオ) 30  $\mu$  L、2ndPrimerLeft を終濃度 1  $\mu$  M、2ndPrimerRight を終濃度 25 nM、テンプレート 2  $\mu$  L を加え滅菌水で 60  $\mu$  L にフィルアップ。95°C5min $\rightarrow$ (94°C30s $\rightarrow$ 55°C30s $\rightarrow$ 72°C20s)  $\times$  40 cycle $\rightarrow$ 72°C3min)
- ④増幅物 60  $\mu$  L に 10 倍濃縮 HBS (pH 7.4) 18  $\mu$  L、4 M NaCl 45  $\mu$  L、Left HEB および Right HEB をそれぞれ終濃度で 1  $\mu$  M 加えて、蒸留水で 180  $\mu$  L にフィルアップ。

## 2.4 SPR センサ応答量の測定

- ①上で作成したチップをセンサにセットし、Cross1 フローセルと Cross1 インジェクションプレートをセットする。
- ②SPR センサを起動し温度が安定するまで静置。調製した試薬類を室温にしておく。
- ③Buffer C を 60  $\mu$  L インジェクトし、測定開始。3 min 保持して、0 点調整を行う。
- ④1 本鎖 DNA サンプルを 60  $\mu$  L インジェクトし 3 min 保持。
- ⑤60  $\mu$  L の Buffer C をインジェクトし 3 min 保持。
- ⑥60  $\mu$  L の 10 mM NaOH をインジェクト。
- ⑦60  $\mu$  L の Buffer C をインジェクト。以降サンプルごとに③から繰り返し。

## 3. 結果

### 3.1 標準サンプルの測定

ヒトゲノムから調製した 1 本鎖 DNA サンプルの測定に先立って、90 mer の増幅産物を模した標準サンプル (A 型および G 型) を委託合成 (シグマアルドリッチ) し、これを Buffer C で希釈して測定を行った。ヒトは 2 組のゲノムを持っており、ある塩基について A 型および G 型の 2 種類の多型がある場合、各個体については A/A 型、G/G 型、A/G 型の 3 パターンが考えられる。そこで、A 型と G 型の標準サンプルをそれぞれ 100 nM に希釈したサンプルと、それらを等量で混合し A 型と G 型がそれぞれ 50 nM 含まれたサンプルを用意し、これらの 3 種類の標準サンプルと各リガンドとの応答を図 1 に示した。矢印 1 でサンプルをインジェクトすると、相補的なリガンドの ch のみ Response が上がっていき、Buffer C をインジェクトしてもそれが保持されていた。次に 10 mM NaOH をインジェクトするとサンプルとリガンドのハイブリダイゼーションが解離し、応答がベースラインに戻った。この結果から SPR センサにより一塩基多型が判定可能であると予想された。

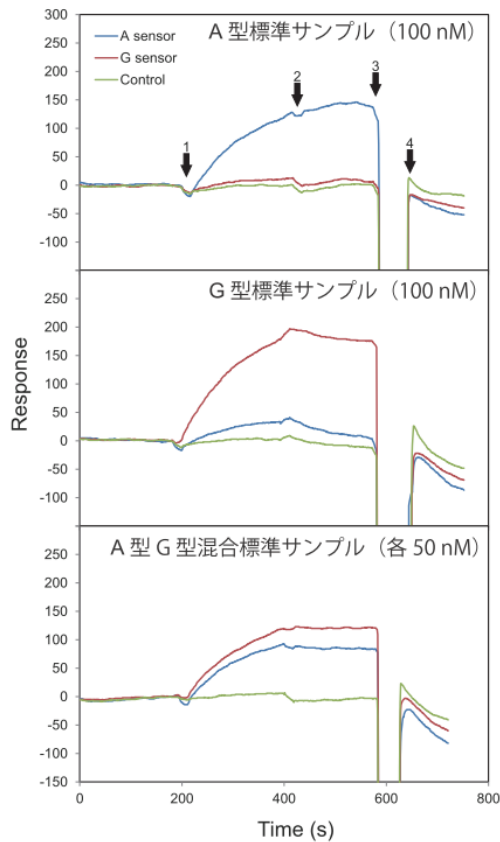


図1 一塩基多型標準サンプルのそれぞれの ch への応答  
 各矢印は次の溶液のインジェクトを示している。1:一塩基多型標準サンプル、2: Buffer C、  
 3: 10 mM NaOH、4: Buffer C。Response は RU 値で表示した。

### 3.2 ヒトゲノムからの増幅サンプルの測定

次にヒトゲノムサンプルを収集して当該する SNP 部の 1 本鎖 DNA サンプルを調製し、応答量を測定した。あらかじめ各サンプルについてダイレクトシーケンシング法により SNP 判定を行い、SPR センサの応答量については A/A, G/G, A/G の各タイプごとの平均値と標準偏差を図 2 に示した。A/A 型の被験者からの増幅物は A sensor に G/G 型は G sensor に A/G 型は両方のセンサに応答を示した。この結果より、例えば 50 RU 以上の応答をポジティブとすることで、SPR センサにより一塩基多型判定が確実にできることが示された。

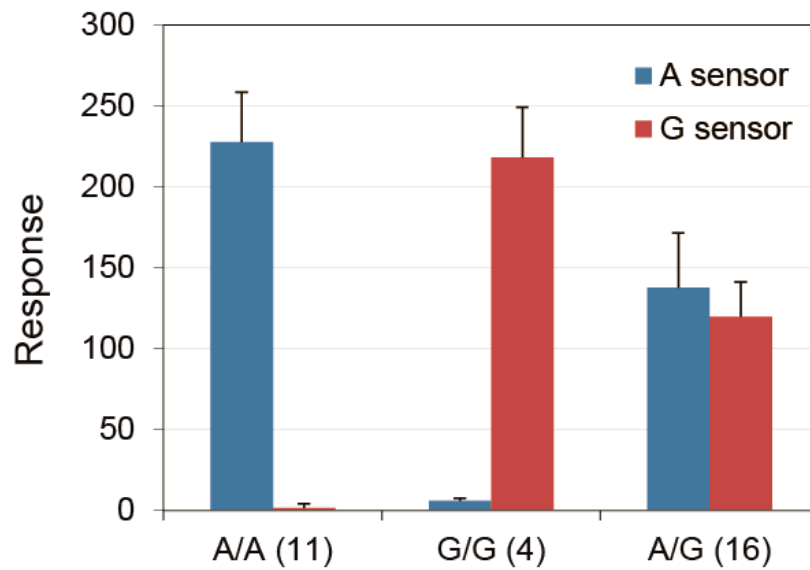


図2 ヒトゲノムサンプルから調製した1本鎖DNAサンプルの応答量  
括弧内の数字はサンプル数を示す。Buffer C への切り替え後における Control センサとの  
差の平均値を示した。エラーバーは標準偏差を示している。

#### 4. 参考文献

- 1) 特許「がん患者に対する免疫療法の治療効果の予測方法、ならびに該方法に用いる遺伝子セットおよびキット」, 特願 2012-522484
- 2) 奥村史朗他, 一塩基多型の簡易タイピングシステムの開発, 福岡県工業技術センター研究報告, No. 19, 37-40 (2009)
- 3) Okumura S, *et.al.*, Single nucleotide polymorphism typing with a surface plasmon resonance-based sensor using hybridization enhancement blockers, *Appl Biochem Biotechnol*, Vol. 174, 494-505 (2014)